

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

*Hipotiroidismo en el adulto:
su influencia en la estructura y función de
la formación hipocampal de la rata*

TESIS DOCTORAL

Iván Fernández de Lamo

Madrid, 2009

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

*Hipotiroidismo en el adulto:
su influencia en la estructura y función de
la formación hipocampal de la rata*

Memoria que presenta el licenciado en Bioquímica
Iván Fernández de Lamo para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directora: Dra. Ana Cristina Guadaño Ferraz
Codirectora: Dra. Ana Montero Pedrazuela

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

Ana Cristina Guadaño Ferraz, Doctora en Ciencias Biológicas, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM) y Profesora Honoraria del Departamento de Bioquímica de la UAM y **Ana Montero Pedrazuela**, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Contratada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM),

CERTIFICAN: que **Iván Fernández de Lamo**, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

**Hipotiroidismo en el adulto: su influencia en la estructura y
función de la formación hipocampal de la rata**

y consideran que el trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expiden el presente certificado en Madrid a 25 de Mayo de 2009.

Fdo. Ana Cristina Guadaño Ferraz
Directora de la tesis

Fdo. Ana Montero Pedrazuela
Codirectora de la tesis

Agradecimientos

Hay tantas personas a las que me gustaría agradecerles su participación, tanto directa como indirecta, en la realización de esta tesis que no sé por donde empezar.....

Gracias por todo a mis papis, no sólo por el apoyo incondicional que siempre me han mostrado, no sólo por haberme enseñado a luchar por mis sueños, no sólo por haber sido los más comprensivos, no sólo por darme esos pequeños empujones que saben que necesito cuando flojeo, si no sobre todo por hacerme sentir orgulloso de ser vuestro hijo. Gracias.

Gracias a mis hermanos, Nacho y Sandra, porque sin vuestra admiración, apoyo y ayuda en los momentos más duros hoy no estaría aquí agradeciándoos tanto. Yo si que os admiro a vosotros. Gracias.

Gracias a ti Ana, porque aparte de ser una inmejorable directora, maestra, jefa (aunque no te guste que te lo diga, jeje), amiga, no es nada comparado con la gran persona que eres. Lo que he aprendido durante estos años a tu lado no es sólo a trabajar concienzudamente, o realizar una tesis, si no a ser mejor persona. Gracias.

Gracias a ti Anita, por tantas cosas..... Por haber tenido la paciencia de aguantarme toooodos los días, por haberme enseñado a trabajar, por ayudarme con todo, todo y todo. Por enseñarme una sonrisa y darme ánimos en los malos momentos, no puedo expresar en palabras todo lo que tengo que agradecerte. Bonita..... esta tesis te la has currado un montón. Gracias sobre todo por ser mi AMIGA.

Gracias a mis compis: MariCarmen por darme un beso todos los días, por apoyarme en todo, por sonreirme cada mañana, por ser así. Jaiño (Ainhoa) porque con tu alegría todo se hace más fácil, tanto a ti como a MariCarmen por que si no fueseis mis confidentes explotaría. Pamper porque con esa energía contagiante y el cariño que rebosas hace que sea un placer venir a trabajar. Dani porque con tu picardía y esas ganas de estar siempre de cachondeo haces que el trabajo sea una fiesta. Sergey Turlinska (Sergio) porque tu constancia se contagia. Javi porque tu practicidad me enseña. Gracias a Pilar porque le gusta tanto enseñar como aprender. Gracias a María (desde Rusia con amor) porque aún agobiada por todo eres capaz de sonreír, ahora desde Barcelona. Gracias a Marina porque aunque no pasamos mucho tiempo juntos en el labo (y eso que te dio tiempo a enseñarme mil cosas) nos hemos ido conociendo por los pasillos y siempre siempre tienes una palabra de ánimo.

Gracias a Juan Bernal por los consejos y por la inestimable ayuda desde la experiencia. Gracias a Bea por tu apoyo y ayuda cuando te he necesitado, Por supuesto gracias a Lali que nunca te has quejado cuando iba a “robar” tus productos al 2.10 y por tu sinceridad. Gracias a Mónica y Ana Torrecilla porque cada vez que tengo una duda o necesito algo siempre estáis para ayudarme, gracias a Diego y Jimena porque nunca podré olvidar a personas como vosotros. Gracias también todo el apoyo de Ricardo y Rosa. Gracias a María Jesús Obregón por tu apoyo, ánimo y por ser mi tutora.

Gracias Gabriela por tu sabiduría y por poner la voz madura de la experiencia en cada uno de sus consejos, gracias Paco por enseñarme con paciencia a operar y a tratar con respeto a los animales.

Gracias a Jesús Pacheco por todos los momentos y las charlas que nos hemos pegado en resonancia (que han sido unas cuantas). Gracias a Pili, por tu apoyo, ayuda, por ser tan directa y sobre todo por sacarme los colores. Gracias a Rocío, Teresass etc. Gracias a Tiago por tus consejos y buen rollo. A Patri por sonreírme todos los días.

Gracias a la gente del animalario del IIB Fernando, Ruth (muchas gracias por haber estado aquí, por nuestras largas charlas y tantos buenos momentos, no dejes de sonreír), Ili, Geny, Cristina, Saleta (que aunque ahora no estes en el animalario para mí perteneces a él, etc....) Por ayudarme cada vez que lo necesitaba y por hacer todo mas fácil, además siempre con una sonrisa, gracias por vuestro apoyo.

Gracias a toda la gente con la que comparto momentos de “pasillo” y hacen que todo se haga más ameno y de gusto venir a trabajar.

Gracias a la gente de gerencia por solucionar los problemas tan rápido, en especial a Jesús por aguantar mis líos y solucionarlos sonriendo y a Alfonso el gerente, que ni gerente ni nada un amigo que me graba CDs (jeje). Gracias a toda la gente de los servicios comunes y a la gente de seguridad (Joaquín, Dani, Manolo, Pablo, Mati, Diego (siempre dando fuerza), Carlos, Ruth, Rafa, Ramón, Fernando por su apoyo toda esta época en la biblioteca y a todos los que no me acuerdo de su nombre pero sí de vuestras caras).

Gracias a la gente de imagen, Antonio, Ricardo y Javi, sois la leche, siempre riendo y lo contagiáis, gracias por vuestra inestimable ayuda en todo.

Gracias a la gente del animalario de la facultad..... Vaya tela, desde luego sois los que mejor os lo montáis con diferencia y no sólo por el buen rollo que lleváis y transmitís, sino por las fiestas de los viernes (por cierto.... Qué hacéis este viernes???) Gracias a ti David por todo, tanto

ayuda, apoyo como charlas, sonrisas tanto dentro como fuera del curro, a ti Marta por sonreír todos los días, por aguantar el vacile y apoyarme en todo, a ti Eli porque tu ayuda siempre es con la mejor actitud, a ti Lis..... que estas perdía (como yo) y por poner un punto de locura en un sitio como este, por cierto Where is my mind? (jejejeje),. Gracias a Manolo que todo lo que tiene de grande lo tiene de buena persona. Gracias a ti Micky por que ese humor es difícil de encontrar y siempre tienes una palabra de ánimo. Gracias a ti Santi por cuidar de todos estos, el animalario no sería nada sin ti. Gracias a ti Carmina por ayudarme, apoyarme y confiar en mí.

Me gustaría dar las gracias de una forma especial a Andrés, antiguo compañero actual amigo, no sabes todo lo que me has enseñado, muchas gracias por apoyarme en todo y animarme a seguir. Gracias.

Gracias a la gente con la que empecé mis andanzas con la investigación. Gracias Juan Emilio por tu consejo, no se me olvidará, gracias a MariCarmen por ser así, única, gracias a Martis por ser tan dulce y ver todo de color de rosa. Gracias a toda la gente del antiguo B-11.

Gracias a la gente de Barcelona, Xavi (recién doctor, por aguantarme, ayudarme, escucharme, apoyarme y por tener siempre un ratito para mí), Laia, y toda la gente del laboratorio de Francesc. En especial, al propio Francesc, por muchas cosas, tanto por sus consejos, como ayuda como apoyo, como correcciones como por mostrarme una de mis devociones (andar por la nieve) y gracias por Benasque.

Gracias a la gente de Sevilla, José María y Agnès, por todo, por tratarme así, por confiar en mí y por su ayuda en todo (más majos..... jejeje). Gracias a María Sutil, a Rocío, a Elena por las tardes de los caipiiii, a Mauricio por toda su ayuda y por enseñarme tantas cosas en tan poco tiempo, gracias a Toni, José Antonio, Raudel etc.... Muchas gracias a Teo por muchas cosas, sobre todo por aguantarme todo, reírse, y respetarme, gracias por hacerme sentir tan bien. Y muchas gracias en especial a María Esteban, lo mejor como persona, compañera, currante y sobre todo como amiga, gracias por tu ayuda Mery.

Gracias a Esteban porque en poco tiempo descubrí a una de las mejores personas que conozco.

Gracias a César Venero por su ayuda con los experimentos de comportamiento.

Gracias a Fernando de Castro por enseñarme que también se puede aprender ciencia fuera de los congresos y laboratorios, jeje.

Gracias a la gente del Cajal, Trejo, María (sonrisa), Alfonso (un artista), Gertru (siempre en positivo), Sol (como su nombre indica) y de una forma especial a Marta, que desde que nos conocimos no has dejado de animarme y de sorprenderme, eres genial.

Gracias a los Bioquímicos por todos los momentos que hemos pasado juntos y porque juntos hemos iniciado esta etapa profesional: Gracias Dani, por estar en todos los momentos, tanto buenos (la mayoría) como malos, gracias Emilio porque con tu forma de ser haces que todo se pueda ver con humor, gracias María, por un montón de cosas..... por escucharme, darme buenos consejos y por animarme en los momentos de bajón, gracias Chini por tus abrazos y sonrisas, anda que no nos lo hemos pasado bien ni ná (jo con lo pequeña que eres y la guerra que das..... gracias por ser así, no cambies). Gracias Lolita, porque tu dulzura nos hace ver todo fácil, gracias Rebequita por ser un terremoto por que siempre tienes cosas que contar y siempre graciosa, gracias Gluca (Gonzalo) por tus ganas de estar siempre bien, lo transmites y lo contagias, gracias Pelos (Álvaro) por ser constructivo y realista nos vienes genial a los que se nos va la cabeza. Gracias Traba por ayudarnos en todo cada vez que dudamos de cualquier cosa de la carrera, eres un crack, gracias Javi por tu simpatía por tu bien estar y por estar siempre donde se te necesita. Gracias por vuestro apoyo.

Gracias a toda la gente que ha tenido que soportarme durante esta última etapa, una de las más duras que pueda recordar, y que sin vuestro apoyo ayuda y sobre todo por haberme hecho reír tanto, esto no lo hubiera pasado con una sonrisa en los labios. Gracias Lidia, la madurez en pequeño, gracias por los consejos. Gracias Vanessa por ser mi auxilio cuando necesitaba evadirme.

En especial me gustaría dar las gracias a Almudena, porque me haces reír, por relajarme con tu voz, por animarme y apoyarme, y sobre todo gracias por enseñarme que existen personas puras, no dejes de sorprenderme....

Gracias a mi gente, Guille porque desde hace 15 años has estado a mi lado, por haber pasado todo junto a mí, por apoyarme en todo y por seguir apoyándome esté donde esté. Gracias Luis, porque te crees que pones un punto serio, pero no te lo crees ni tú, eres un artista, gracias Mauro (ese gran desconocido) porque tienes la forma más peculiar de ser, así que siempre nos sorprendes, gracias Anita, Vero y Aroa por todo vuestro apoyo y sobre todo por cuidar de estos bandarras. Gracias a Coco (Alfonso) que aunque no podamos hablar mucho no dejo de recibir todo su apoyo y admiración cada vez que nos vemos. Gracias Pedrito, porque no has dejado de animarme en todo momento y siempre has puesto un punto de objetividad. Gracias Javi porque aunque estés lejos, no dejas de mandarme fuerza para seguir con todo adelante. Gracias Maribel, tu has sido un pilar en esta tesis y gran parte de ella la has vivido en primera persona, gracias por

haberme apoyado, por aguantarme de todo, por haberme animado, por haberme admirado, por haberme acompañado y haberte sentido tan orgullosa de mí como tantas veces me has dicho. Gracias de verdad. Y a ti Raúl, qué? qué te digo a ti? Si sabes tanto de mi tesis y de mi vida como yo. Has estado en todos y cada uno de los momentos de esta tesis, has sido mi hombro en los malos momentos y mi compañero de fiesta en los buenos. Esta tesis sin la fuerza que me has transmitido no hubiera sido posible. No tengo palabras para expresarte mi gratitud, espero poder demostrártela en actos, y si te doy las gracias por algo, es por ser mi AMIGO. Gracias, gracias y gracias.

Si os dais cuenta, no he dejado de repetir gracias por vuestro apoyo y es que un punto de apoyo es algo estable en lo que nos ayudamos para superar los obstáculos y eso es justamente lo que he necesitado, a todos y cada uno de vosotros porque esta tesis no hubiera sido posible sin vosotros.

Gracias a todos por estar y muy especialmente a los que no están.

GRACIAS DE TODO CORAZÓN.

Iván

Resumen

Las disfunciones más dramáticas causadas por la deficiencia de hormonas tiroideas (TH: T4 y T3), especialmente en el periodo fetal, son las alteraciones neurológicas, principalmente ocasionadas por anomalías en el desarrollo cerebral. Numerosos estudios experimentales y epidemiológicos han aportado gran información sobre las acciones de las HT en el desarrollo cerebral, pero hay pocos estudios que exploren las acciones de las HT en el cerebro adulto. El hipotiroidismo en el hombre tiene una elevada incidencia en la población adulta y se ha relacionado con disfunciones cognitivas, incluyendo déficits en procesos de aprendizaje y memoria y alteraciones del estado de ánimo. Además, existen protocolos clínicos establecidos que incluyen la retirada del tratamiento con HT, periódicamente y durante varias semanas, para el seguimiento de posibles recidivas en pacientes tiroidectomizados por padecer cáncer diferenciado de tiroides.

El principal objetivo de esta tesis ha sido caracterizar posibles anomalías estructurales y funcionales en la formación hipocampal, debidas a la deficiencia de HT en el adulto. Esto se ha realizado con estudios *in vivo* y con la rata como modelo experimental. También se ha analizado la eficacia de un tratamiento de reemplazo hormonal para recuperar las alteraciones detectadas.

Los resultados indican que un corto periodo de hipotiroidismo en el adulto induce alteraciones estructurales y metabólicas específicas en la formación hipocampal e interfiere con procesos de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo. Algunas de estas alteraciones debidas al hipotiroidismo no se recuperan tras dos meses de un tratamiento de reemplazo hormonal que normaliza los niveles plasmáticos de HT.

Nuestros estudios no sólo contribuyen al entendimiento del papel de las HT en la actividad y la plasticidad del cerebro adulto si no que también esclarecen importantes aspectos de la fisiopatología cerebral del hipotiroidismo en el adulto. Nuestros resultados sugieren claramente que las terapias de reemplazo hormonal no reparan por completo algunas de las disfunciones hipocampales tras un periodo breve de hipotiroidismo en el adulto, lo cual recomienda mejoras en el diagnóstico de esta enfermedad y una extensa revisión de los protocolos clínicos que inducen hipotiroidismo en el adulto, incluso por breves periodos de tiempo.

Summary

The most dramatic dysfunctions caused by thyroid hormones (TH: T4 and T3) deficiency, especially during fetal life, are neurological disorders, principally due to impaired brain development. A great deal is known about TH actions during development, but little is known on the neurobiology of TH actions in the adult brain. Hypothyroidism in humans has an elevated incidence in the adult population and is related to cognitive dysfunctions, including learning and memory deficits, and mood disorders. In addition, there are established clinical protocols that include TH withdrawal periodically during several weeks to follow up recurrence in thyroidectomized patients with differentiated thyroid cancer.

The main objective of this thesis has been the exploration of structural and functional alterations in the adult hippocampal formation due to TH deficiency at adult stages by using *in vivo* studies with the rat as an experimental model. It has been also analyzed the effectiveness of a TH replacement treatment in the recovery of the detected alterations.

The results show that a short period of adult onset hypothyroidism induces specific hippocampal structural and metabolic alterations and interferes with hippocampus-dependent learning and memory processes. Some of these alterations are not recovered by a two-month hormonal replacement treatment, which normalizes TH plasma levels.

Our studies not only contribute to understand the role of TH on adult brain activity and plasticity, but also shed light on the brain pathophysiology of adult hypothyroidism. Our results strongly suggest that TH replacement therapies do not completely repair some of the hippocampal dysfunctions evoked by hypothyroidism, which recommends improvements in the diagnosis of this illness, and a careful revision of the clinical protocols that induce adult hypothyroidism, even for short periods of time.

Índice

ABREVIATURAS.....	i
INTRODUCCIÓN	1
1. LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	2
1.1 Síntesis, secreción y transporte de las hormonas tiroideas.....	3
1.2 Metabolismo de las hormonas tiroideas.....	4
1.3 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas.....	6
1.3.1 Modulación de la expresión génica.....	6
1.3.2 Mecanismos extranucleares de acción de las hormonas tiroideas.....	8
1.4 Efectos de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso: hipotiroidismo	9
1.4.1 El hipotiroidismo durante el desarrollo del sistema nervioso	10
1.4.2 El hipotiroidismo en el sistema nervioso adulto	10
1.4.2.1 Alteraciones metabólicas por falta de hormonas tiroideas en el cerebro adulto	11
2. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL.....	13
2.1 ESTRUCTURA DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL	13
2.1.1 Anatomía del hipocampo en la rata adulta	13
2.1.2 Anatomía del giro dentado en la rata adulta.....	14
2.1.3 Conexiones de la formación hipocampal	14
2.2 FUNCIONES DE LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL	16
2.2.1 Aprendizaje y memoria.....	16
2.2.1.1 Bases celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria	16
2.2.1.2 La formación hipocampal en aprendizaje y memoria.....	17
2.2.1.3 Implicaciones de las hormonas tiroideas en la plasticidad sináptica del hipocampo	18
2.2.2 Estado de ánimo: la depresión	20
2.2.2.1 La formación hipocampal en la depresión	20
2.2.2.2 Implicaciones de las hormonas tiroideas	20
OBJETIVOS	22

MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	25
1.1 Tiroidectomía quirúrgica.....	26
1.2 Tratamiento crónico con hormonas tiroideas.....	27
1.3 Sacrificio de los animales y obtención del tejido	27
1.4 Determinación de la concentración de hormonas tiroideas.....	28
1.4.1 Síntesis de T3 y T4 marcadas radiactivamente.....	28
1.4.2 Extracción de T3 y T4 del plasma	29
1.4.3 Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma mediante radioinmunoanálisis.....	29
2. ESTUDIO DE LOS POTENCIALES AUDITIVOS EVOCADOS DEL TRONCO CEREBRAL.....	30
3. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y DE APRENDIZAJE Y MEMORIA: CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DEL REFLEJO PALPEBRAL...	31
3.1 Implante crónico de electrodos.....	31
3.2 Estudios de aprendizaje y memoria utilizando el condicionamiento clásico del reflejo palpebral.....	33
3.2.1 Características específicas del condicionamiento clásico.....	33
3.2.2 Periodo de habituación.....	33
3.2.3 Periodo de condicionamiento	34
3.2.4 Periodo de extinción.....	35
3.3 Estudios de la actividad sináptica.....	35
3.3.1 Estudio de los potenciales de campo durante el condicionamiento.....	35
3.3.2 Prueba de pulsos pareados.....	35
3.3.3 Perfil de intensidades	36
3.3.4 Potenciación a largo plazo (LTP)	36
4. TINCIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE NISSL	38
5. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	38

5.1 Procedimiento de inmunohistoquímica	39
5.2 Análisis de la expresión de proteínas y anticuerpos utilizados	39
6. VOLUMEN DEL GIRO DENTADO.....	41
7. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA DE PROTÓN.....	41
8. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE SEROTONINA EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL POR MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL <i>IN VIVO</i>	42
8.1 Construcción de las sondas de microdiálisis	43
8.2 Implante de las sondas de microdiálisis	43
8.3 Obtención de muestras.....	44
8.4 Administración de fármacos.....	44
8.5 Análisis de las muestras obtenidas	45
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
RESULTADOS	47
1. GRUPOS EXPERIMENTALES	48
1.1 Caracterización del estado tiroideo de los animales	48
1.1.1 Ganancia de peso corporal	48
1.1.2 Concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas.....	49
2. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA CAPACIDAD AUDITIVA.....	50
3. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE.....	51
4. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DURANTE EL APRENDIZAJE	52
5. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DE LA SINAPSIS VÍA PERFORANTE-GIRO DENTADO	56
5.1 Análisis del perfil de intensidades	56
5.2 Estimulación por pulsos pareados	57

5.3 Potenciación a largo plazo (LTP).....	58
6. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON ACTIVIDAD Y PLASTICIDAD NEURONAL EN LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO	60
6.1 Subunidad del receptor del neurotransmisor excitatorio glutamato NR1	60
6.2 Proteínas específicas de interneuronas GABAérgicas inhibitorias PV y GAT-1	61
6.3 Proteína de expresión temprana c-Fos.....	65
6.4 Proteína estructural de densidades postsinápticas PSD-95.....	65
6.5 Proteína específica de neuroblastos y neuronas inmaduras DCX	68
7. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN EL METABOLISMO DE LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO.....	69
8. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LOS NIVELES DE SEROTONINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL.....	70
DISCUSIÓN	73
1. Adquisición del condicionamiento clásico del reflejo palpebral	74
2. Plasticidad sináptica	76
3. Bases moleculares y celulares de la plasticidad	80
4. Metabolismo en la formación hipocampal dorsal.....	83
5. Alteraciones en los niveles de serotonina por el hipotiroidismo adulto	86
6. Conclusiones finales	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	92

ANEXO I. PUBLICACIONES RELACIONADAS..... 109

Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. Eur J Neurosci. En prensa.

Iván Fernández-Lamo, Ana Montero-Pedrazuela, José María Delgado-García, Ana Guadaño-Ferraz y Agnès Gruart 110

ANEXO II. OTRAS PUBLICACIONES 151

Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior Mol Psychiatry. 2006 Apr;11(4):361-71.

Ana Montero-Pedrazuela, César Venero, Rosalía Lavado-Autric, Ivan Fernández-Lamo, José Manuel García-Verdugo, Juan Bernal y Ana Guadaño-Ferraz 152

Abreviaturas

8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina
+	Células o procesos inmunopositivos
ABR	Auditory Brainstem Response (potenciales auditivos evocados del tronco del encéfalo)
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Antero-posterior
BSA	Bovine Serum Albumin (seroalbúmina bovina)
CA	Cornu Ammonis, asta de Amón
D1, D2, D3	Desyodasas tipo 1, 2 y 3
DCX	Doublecortin (Doblecortina)
DE	Diámetro externo
DI	Diámetro interno
DV	Dorso-ventral
E	Grupo de animales eutiroides
EC	Estímulo Condicionado
EI	Estímulo Incondicionado
fEPSP	field Excitatory Post Synaptic Potencial (potencial de campo excitatorio postsináptico)
GABA	Gamma Amino Butyric Acid (ácido gamma amino butírico)
GAT-1	Transportador 1 de GABA
GD	Giro Dentado
H	Grupo de animales hipotiroideos
HFS	High Frequency Stimulation (estimulación de alta frecuencia)
HT	Hormonas Tiroideas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HR-MAS	Proton High Resolution Magic Angle Spinning spectroscopy (espectroscopía de resonancia magnética de protón)
i.p.	Intraperitoneal
L	Lateral
LCR	Líquido Ceforraquídeo
LTD	Long Term Depression (depresión a largo plazo)
LTP	Long Term Potentiation (potenciación a largo plazo)
NMDA	Ácido N-Metil-D-Aspártico
NR-1	Subunidad 1 del Receptor de Glutamato de tipo NMDA
P	Día postnatal (P95, P120,...)
PB	Phosphate Buffer (tampón fosfato)
PB-azida	PB 0,1M con azida al 0,05%
PBS	Phosphate buffer saline (tampón fosfato salino)
PRP	Primera respuesta postsináptica
PSD-95	Post Synaptic Density
PV	Parvalbúmina

R	Grupo de animales con reemplazo hormonal
RIA	Radioinmunoanálisis
rT3	3,5,5'-triyodo-L-tironina o T3 reversa
RXR	Receptor del ácido 9-cis-retinoico
SD	Desviación estándar
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SRP	Segunda respuesta postsináptica
T2	Diyodo-L-tironina
T3	3,5,3'-triyodo-L-tironina
T4	Tiroxina o 3,5,3',5'-tetrayodo-L-tironina
TR	Thyroid hormone Receptor (receptor de hormonas tiroideas)
TRE	Thyroid hormone Response Element (elemento de respuesta a HT)
TRH	Thyrotrophin Releasing Hormone (hormona liberadora de tirotropina)
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone (hormona estimuladora del tiroides)
UA	Unidades Arbitrarias
VP	Vía Perforante

Introducción

Algo de historia

La prevalencia, naturaleza y el curso clínico de los cambios psicológicos y del comportamiento que ocurren en el hipotiroidismo adulto fueron descritos ya en la segunda mitad del siglo XIX. En 1888, la Sociedad Clínica de Londres describe a los pacientes mixedematosos (hipotiroideos), muchos de los cuales presentaban alteraciones mentales, con una serie de características comportamentales y psicológicas como irritabilidad, agorafobia, melancolía y demencia (Ord, 1888).

Las alteraciones presentes en los pacientes hipotiroideos adultos, especialmente en fases tempranas de la enfermedad, confundieron el diagnóstico clínico, y por ello era frecuente encontrar este tipo de pacientes en hospitales mentales (Asher, 1949). Esta situación ha sido mejorada enormemente, pero siguen apareciendo casos aislados de hipotiroidismo sin diagnosticar ni tratar con una alteración mental severa ya que muchos de los síntomas (psicológicos y comportamentales) del hipotiroidismo adulto solapan con los síntomas de otras enfermedades como psicosis, demencia y depresión (Jellinek, 1962; Treadway *et al.*, 1967; Whybrow *et al.*, 1969). En esta tesis se ha intentado profundizar en el conocimiento de distintos aspectos de la fisiopatología cerebral del hipotiroidismo en el adulto y en la evolución del tratamiento de esta enfermedad con terapias de reemplazo hormonal.

1. LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (HT) son muy importantes en la regulación de procesos que intervienen en el crecimiento, diferenciación y metabolismo de la mayoría de los tejidos de los vertebrados, siendo necesarios niveles eutiroides de HT para el correcto funcionamiento de numerosos órganos como el hígado, corazón, tejido adiposo, intestino o músculo, y en especial del sistema nervioso. De hecho, son muy llamativos los graves efectos negativos resultantes de la deficiencia de HT en el desarrollo y función del sistema nervioso central (SNC). En especial, las graves alteraciones neurológicas debidas a la deficiencia de HT en las fases iniciales de su desarrollo, que provocan retraso mental severo, anormalidades neurológicas, retraso del crecimiento y desarrollo puberal anormal, así como síntomas endocrinos y signos de hipotiroidismo. Las HT también tienen una gran importancia en el cerebro adulto. En el individuo adulto las alteraciones del estado tiroideo pueden ocasionar, además de

manifestaciones metabólicas, trastornos de carácter neurológico o psiquiátrico produciendo situaciones patológicas y alteraciones en la conducta.

1.1. Síntesis, secreción y transporte de las hormonas tiroideas

Las HT, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), son hormonas yodadas derivadas del aminoácido tirosina, que se sintetizan en la glándula tiroides (Figura 1).

El tiroides se localiza en la porción media del cuello, a ambos lados de la tráquea, y está compuesto por folículos. Estos folículos están constituidos por las células epiteliales foliculares o tirocitos que se sitúan en esferas alrededor de una cavidad central rellena de coloide que contiene tiroglobulina. Los tirocitos sintetizan la tiroglobulina y a partir de ella, las HT. Los aminoácidos yodados y las tironinas se almacenan como residuos de la tiroglobulina en el folículo tiroideo. Los tirocitos son células polarizadas con una membrana basal del lado del torrente circulatorio y una apical que da al coloide.

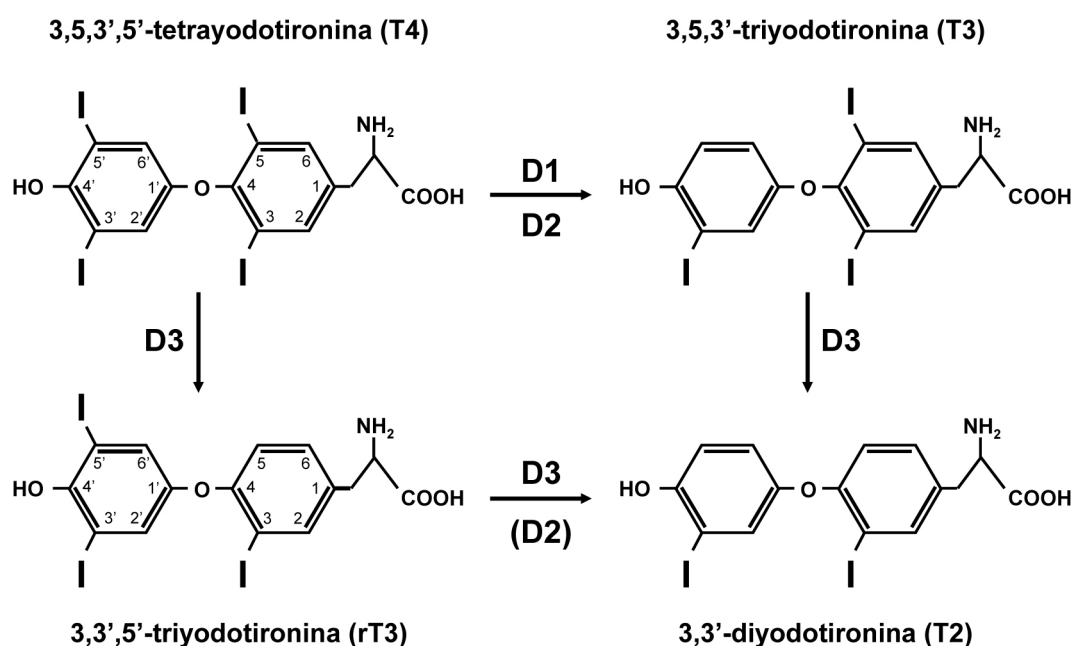


Figura 1. Estructura y metabolismo de las hormonas tiroideas: T4 y T3. Las HT están constituidas por dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno. Los átomos de yodo se encuentran en número máximo de cuatro en las posiciones 3, 5, 3' y 5' y su número y posición son críticos para definir la actividad biológica de las HT y sus metabolitos. Se indican con flechas las principales reacciones de desyodación y las enzimas (desyodasas) que las catalizan (D1, D2 y D3).

El yodo es un micronutriente muy escaso pero los tirocitos son capaces de concentrarlo en su interior por transporte activo, a través del transportador de yodo (NIS) y sintetizar precursores de las HT que se almacenan en el coloide como residuos de la tiroglobulina. Esto permite la disponibilidad de HT en cuanto se necesiten sin depender de la ingesta de yodo en la dieta.

La síntesis y secreción de HT está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. En el núcleo paraventricular del hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de tirotropina (TRH) cuya función principal es inducir la secreción de la hormona estimuladora del tiroides (TSH o tirotropina) en la hipófisis anterior. La TSH se une a su receptor de membrana en los tirocitos y estimula la síntesis y secreción de HT. Existe un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa que contribuye a la homeostasis hormonal. Las HT actúan directamente sobre la hipófisis inhibiendo la liberación de TSH y sobre el hipotálamo inhibiendo la secreción de TRH.

Las HT circulan en el plasma unidas a proteínas: la TBG o globulina de unión a HT, la transtiretina y la albúmina. La pequeña fracción de T3 y T4 libres, que circulan no unidas a proteínas son las biológicamente activas, ya que pueden introducirse en las células para llevar a cabo sus acciones biológicas. Tradicionalmente se pensaba que las HT, debido a su naturaleza lipofílica, eran capaces de atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva. Sin embargo, recientemente se ha descrito que las HT se transportan al interior celular en los distintos tejidos a través de transportadores específicos pertenecientes a tres familias de transportadores: los transportadores de aniones orgánicos (OATP), los transportadores heterodiméricos de aminoácidos (HAT) y los transportadores de monocarboxilatos (MCT). En concreto, en el cerebro del ratón, las HT se transportan por los transportadores MCT8, MCT10, OATP2, OATP14, HAT1 y HAT2, que se expresan, en diferentes combinaciones, tanto en la barrera hematoencefálica y en los plexos coroideos, como en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Friesema *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2008; Ceballos *et al.*, 2009). Este descubrimiento añade un nuevo mecanismo de regulación de la disponibilidad hormonal para las células.

1.2. Metabolismo de las hormonas tiroideas

En condiciones fisiológicas y de aporte suficiente de yodo, la glándula secreta cantidades de T4 (70%) superiores a las de T3 (20%; Silva & Larsen, 1986).

Las HT se metabolizan en los tejidos periféricos por varias rutas metabólicas, aunque la vía más importante es la desyodación progresiva (ver Figura 1). Las principales reacciones de desyodación son: 1) la desyodación de la T4 a T3 por pérdida de un átomo de yodo en la posición 5' del anillo externo y 2) la desyodación de T4 y T3 en la posición 5 del anillo interno, produciendo rT3 (T3 reversa o 3,3',5'-triyodotironina) y T2 (3,3'-diyodotironina), respectivamente (Köhrle, 2002).

La desyodasa tipo 1 (D1) cataliza reacciones de desyodación tanto en 5' (anillo externo) como en 5 (anillo interno). Esta enzima es casi ubicua, pero se expresa en niveles máximos en órganos que permiten un rápido intercambio de las HT con el plasma (hígado, piel y riñón) y su actividad contribuye a los niveles de T3 plasmáticos. También se expresa en el tiroides, donde contribuye a la generación de T3. La D1 se expresa en el encéfalo de rata, pero su contribución a la generación local de T3 es poco conocida en este tejido.

La desyodasa tipo 2 (D2) cataliza la desyodación de T4 en la posición 5' generando T3, aunque la rT3 también es sustrato de esta enzima. La D2 se expresa en tejidos en los que las concentraciones intracelulares de T3 son críticas (sistema nervioso, hipófisis, tejido adiposo marrón). Su función es la generación local de T3 intracelular en estos tejidos y también se ha demostrado que contribuye de una manera importante a los niveles de T3 circulantes (Maia *et al.*, 2005). En el cerebro, la D2 se expresa en tanicitos y astrocitos (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1997b), por lo que se ha propuesto un modelo de cooperación paracrina o acoplamiento celular entre los astrocitos y las neuronas y oligodendrocitos. En este modelo, la T4 sería captada de la sangre por los astrocitos, donde se desyodaría a T3 que podría entonces ser captada por las neuronas y oligodendrocitos, que se consideran las principales células diana de las HT en el SNC. La actividad D2 en los astrocitos estaría acoplada a las necesidades neuronales de T3, ya que para mantener la homeostasis cerebral de T3, cuando hay bajos niveles plasmáticos de T4 circulante, aumenta la actividad y la expresión de la D2 cerebral (Obregón *et al.*, 1991; Guadaño-Ferraz *et al.*, 1999).

La desyodasa 3 (D3) metaboliza la T4 y la T3 por desyodación en posición 5, dando lugar a rT3 y 3', 3-T2 respectivamente. Esta enzima se expresa en niveles bajos en todos los tejidos, pero su expresión es más elevada en el SNC, la piel, la placenta y el útero gestante. La D3 contribuye a la homeostasis hormonal, protegiendo a los tejidos del exceso de HT. En el encéfalo se expresa en neuronas, donde parece controlar la concentración y el tiempo de acción de la T3. Su expresión es máxima durante el periodo fetal y perinatal (Kaplan & Yaskoski, 1981) y está relacionada con la diferenciación sexual del cerebro (Escámez *et al.*, 1999).

1.3. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

1.3.1 Modulación de la expresión génica

La función principal de las HT es la modulación de la expresión génica por unión a sus receptores nucleares específicos (TRs). La T3 es la hormona biológicamente activa por su elevada afinidad por la unión a los TRs, aunque la T4 también puede unirse con baja afinidad (Surks & Oppenheimer, 1977). En las células diana, la T3 se concentra de forma eficiente en el núcleo donde se une a sus receptores. Los TRs son factores de transcripción modulados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Los TRs se unen a secuencias específicas del DNA en los genes diana denominadas elementos de respuesta a hormona tiroidea (TRE). La unión de los TRs al TRE tiene lugar, principalmente, formando heterodímeros con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (RXR; Figura 2), aunque también pueden homodimerizar (Lazar, 1993).

Los TRs están codificados por dos genes: *THRA* o *alfa* (α) y *THRB* o *beta* (β), que dan lugar a distintas isoformas.

El gen α codifica una forma funcional, TR α 1, y tres formas truncadas que no unen hormona, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1 y TR $\Delta\alpha$ 2. La función fisiológica de estas formas truncadas no se conoce con claridad, aunque la isoforma TR α 2 es muy abundante en el encéfalo (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1997a). Además de las isoformas descritas, la transcripción en dirección contraria del gen α da lugar a un factor de transcripción, rev-ErbA α (Lazar *et al.*, 1989; Miyajima *et al.*, 1989), que desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebelo (Chomez *et al.*, 2000).

El gen β codifica tres formas capaces de unir hormona: TR β 1, TR β 2 y TR β 3, y una forma que une hormona pero no se une al DNA, el TR $\Delta\beta$ 3 que actúa como un potente represor *in vitro* (Harvey & Williams, 2002).

Los TRs tienen una estructura muy conservada con un dominio central de unión al DNA, que posee una estructura de dos dedos de zinc (Freedman, 1992). La región carboxi-terminal contiene los dominios de dimerización y unión al ligando y las zonas de interacción con co-activadores y co-represores. La región amino terminal es la más variable y puede contribuir a la especificidad del receptor (Aranda & Pascual, 2001).

En el SNC se han encontrado todas las isoformas de los TRs. Las isoformas TR α son más abundantes y están más ampliamente distribuidas en el SNC que las TR β . El conocimiento de la distribución regional de los TRs, así como el análisis de animales transgénicos de los mismos y la utilización de aproximaciones farmacológicas, ha permitido establecer ciertas funciones fisiológicas específicas para las distintas isoformas de receptor en el SNC (Ng *et al.*, 2001; Guadaño-Ferraz *et al.*, 2003; Manzano *et al.*, 2003; Dupre *et al.*, 2004; Venero *et al.*, 2005; Manzano *et al.*, 2007; Denver *et al.*, 2009).

El mecanismo de acción general de la regulación de la expresión génica por T3 es la regulación positiva (Figura 2). La unión de T3 al TR tiene dos efectos: anula la represión y, dependiendo de la concentración de hormona y del gen diana, aumenta la transcripción (Li *et al.*, 1999).

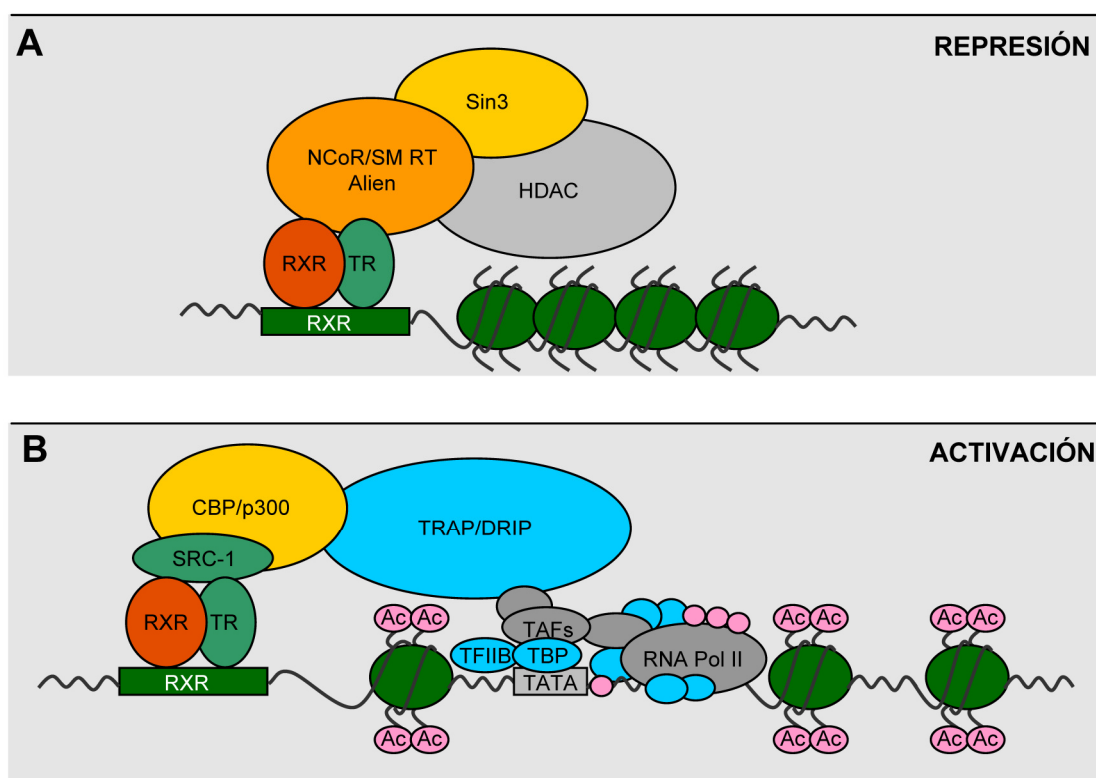


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción general de la modulación de la expresión génica por T3. Los TRs se unen a los TRE heterodimerizando con el receptor RXR. (A) En ausencia de hormona el heterodímero se asocia con un complejo co-represor, lo que conduce a la desacetilación y compactación de la cromatina, y a la represión de la transcripción. (B) La unión de T3 al TR produce un cambio conformacional que induce la liberación de los co-represores y unión de un complejo de co-activadores. Este complejo tiene capacidad acetilasa de histonas, lo que desestabiliza la cromatina y la hace más accesible. Además atrae y estabiliza la RNA polimerasa II.

Además de este mecanismo general, puede tener lugar una regulación negativa, cuyo mecanismo es poco conocido. En la regulación negativa, el receptor en ausencia de ligando permite la transcripción basal del gen, y la unión del ligando al receptor induce la represión génica (esto ocurre por ejemplo en el caso de las subunidades de la TSH mediado por TR β 2). No se han identificado secuencias consenso ni requerimientos estructurales comunes para los TREs negativos.

1.3.2. Mecanismos extranucleares de acción de las hormonas tiroideas

Las acciones nucleares de las HT tienen un tiempo de latencia largo (de horas a días). Sin embargo, se han descrito acciones mediadas por HT que ocurren en un periodo de tiempo muy corto (pocos minutos; Yen, 2001). Estas son las respuestas rápidas extranucleares, que son menos conocidas. Algunas de las acciones extragenómicas están mediadas por receptores de membrana acoplados a proteínas G señalizando a través de segundos mensajeros intracelulares. Ya en el año 1982 se describieron sitios de unión específicos para la T3 en la membrana plasmática (Segal & Ingbar, 1982). Otras acciones están mediadas por la unión de las HT a isoformas de TRs en el citoplasma: de la T3 a TRs o de la T4 a TRs truncados (Davis *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que en algunos tejidos las HT pueden controlar los niveles intracelulares de Ca²⁺, el tráfico citoplasma-núcleo de proteínas intracelulares (incluidos factores de transcripción como los TRs), la activación de proteínas quinasas y la solubilidad de la actina (Roussel *et al.*, 1995; Davis & Davis, 2002; Davis *et al.*, 2002). Recientemente se ha publicado la regulación de la fosforilación de proteínas sinaptosomales por T3 en la corteza cerebral de ratas adultas y el papel que juegan el Ca²⁺ y la calmodulina en este proceso (Sarkar, 2008).

Se ha postulado que las acciones extranucleares de T4 y T3 influyen sobre la transcripción génica a través de las cascadas MAPK, STATs y PI3K (Davis *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2005; Moeller *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2008). La vía de señalización de las MAPK puede ser activada por la unión de T4, y en menor medida T3, a la integrina α V β 3, localizada en la membrana celular, sin que las HT entren en la célula. Este mecanismo produce la fosforilación de factores de transcripción que pueden inducir angiogénesis y promover el crecimiento celular (Tang *et al.*, 2004; Bergh *et al.*, 2005). Otros estudios recientes profundizan en las acciones no genómicas del complejo T3- TR β en fibroblastos humanos y del complejo T3-TR α en células endoteliales a

través de la modulación de PI3K. Estas acciones, aunque no requieren la síntesis de proteínas, sí requieren la unión de la T3 a un TR y su efecto último puede ser tanto modular la actividad enzimática (e-NOS) como cambios directos (HIF-1 α) e indirectos en la expresión génica (ZAKI-4 α , GLUT1, PFKP; Cao *et al.*, 2005; Hiroi *et al.*, 2006; Moeller *et al.*, 2006).

A nivel mitocondrial, las HT ejercen acciones sobre las mitocondrias regulando la transcripción de genes nucleares cuyos productos modulan la expresión de genes mitocondriales. También se han descrito acciones directas sobre la expresión del genoma mitocondrial y la fosforilación oxidativa (Martínez *et al.*, 2009). Muchas de estas acciones están mediadas por receptores mitocondriales de HT que modulan la expresión del genoma mitocondrial actuando como factores de transcripción dependientes de ligando (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001).

1.4. Efectos de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso: hipotiroidismo

Las acciones de las HT en el SN son aún más complejas que en otros órganos debido a la heterogeneidad regional y celular de este tejido. Distintos estudios clínicos y experimentales indican que la deficiencia de HT en periodos críticos durante el desarrollo causa anomalías estructurales y alteraciones neurológicas graves e irreversibles. La hipotiroxinemia materna por deficiencia de yodo en la dieta es la causa más extendida de retraso mental prevenible en el mundo. Las HT también son necesarias para mantener la actividad y función del SN durante la vida adulta, aunque sus acciones biológicas en el periodo adulto han sido menos estudiadas.

El hipotiroidismo es la deficiencia hormonal más común, siendo más frecuente en las mujeres y aumentando su incidencia con la edad. La frecuencia total del hipotiroidismo (clínico y subclínico) puede llegar a ser de un 8% (Vanderpump & Tunbridge, 2002). El hipotiroidismo clínico está definido por niveles bajos de HT en sangre con la consiguiente elevación de la concentración plasmática de TSH. En la práctica clínica se considera hipotiroidismo subclínico cuando sólo se encuentra elevada la TSH.

Las causas más habituales de hipotiroidismo son la disgenesia tiroidea, la ablación quirúrgica o por irradiación del tiroides y la tiroiditis. El consumo de alimentos bociógenos (yuca, mijo, coles), factores iatrógenos (litio, amiodarona, interferón α) o compuestos tóxicos (bifenilos policromados, resorcinol) también puede inducir o agravar el hipotiroidismo.

1.4.1. El hipotiroidismo durante el desarrollo del sistema nervioso central

El papel fisiológico de las HT durante el periodo embrionario consiste en asegurar la coordinación temporal de diferentes eventos del desarrollo modulando la expresión y actividad de proteínas específicas e influyendo en la diferenciación celular. Con estudios experimentales en los que se analizaba el efecto de la deficiencia de HT, se ha establecido que el periodo crítico para la deficiencia de HT en el SN es el desarrollo embrionario tardío y el postnatal temprano en rata (Bernal, 2005b). Estudios recientes en humanos indican que las HT también son importantes en estadios más tempranos del desarrollo cerebral fetal (de Escobar *et al.*, 2007). El hipotiroidismo durante el desarrollo conduce a alteraciones moleculares y anatómicas en el cerebro que inducen alteraciones neurológicas y neuropsicológicas irreversibles, como retraso mental, sordera y desórdenes neuromotores (Bernal, 2005a). Se ha propuesto que el papel principal de la T3 durante el desarrollo sea desreprimir la transcripción de los genes regulados en momentos determinados (Morte *et al.*, 2002).

Las regiones más afectadas por la deficiencia de HT durante el desarrollo son la neocorteza, los ganglios basales, el cerebelo, el hipocampo y el giro dentado (GD). Todas estas regiones están implicadas en la memoria y el aprendizaje, así como en tareas motoras, lo que explicaría muchas de las alteraciones funcionales debidas al hipotiroidismo.

1.4.2. El hipotiroidismo en el sistema nervioso adulto

Las acciones de las HT en el SN adulto se han estudiado poco, pero en humanos se han descrito importantes disfunciones mentales y psicológicas asociadas al hipotiroidismo (Boyages, 1996; Whybrow, 1996). El hipotiroidismo adulto provoca alteraciones de la memoria, el aprendizaje y la concentración, astenia psicomotora, modificación de los niveles de neurotransmisores y alteraciones del comportamiento (demencia, confusión, psicosis y cambios de personalidad) y del estado de ánimo (depresión, trastorno bipolar). Muchas veces un tratamiento hormonal prolongado es incapaz de recuperar estas alteraciones, lo que indica que no se puede excluir un leve deterioro persistente (Leentjens & Kappers, 1995; Capet *et al.*, 2000; del Ser Quijano *et al.*, 2000; Saravanan *et al.*, 2002; Roberts & Ladenson, 2004).

Muchos de los síntomas asociados al hipotiroidismo también son frecuentes en pacientes con depresión y se ha establecido una relación entre las HT y los desórdenes del estado de ánimo. Se ha determinado que entre un 8-17% de los pacientes con depresión presentan

hipotiroidismo (Gold *et al.*, 1981; Prange, 1996), siendo subclínico en la mayoría de los casos. Además esta frecuencia aumenta en pacientes refractarios al tratamiento con fármacos antidepresivos (Howland, 1993; Gloger *et al.*, 1997). Por estos motivos, se recomienda examinar la función tiroidea de pacientes con desórdenes del estado de ánimo y tratar las disfunciones tiroideas subclínicas con HT. También se recomienda que los pacientes hipotiroideos con trastornos del estado de ánimo sigan terapias de reemplazo hormonal, con criterios más estrictos que los pacientes sin patología psiquiátrica (Haggerty & Prange, 1995).

En los pacientes con trastornos del estado de ánimo sin enfermedad tiroidea que responden al tratamiento con fármacos antidepresivos, el tratamiento adyuvante con HT (T3 o T4) se usa como acelerador de la respuesta (Prange *et al.*, 1969; Altshuler *et al.*, 2001). En los pacientes refractarios o que responden parcialmente al tratamiento con fármacos antidepresivos, el tratamiento con HT se utiliza como potenciador de las acciones de los antidepresivos (Joffe & Singer, 1990; Aronson *et al.*, 1996). En regiones cerebrales implicadas en la modulación del estado de ánimo, como la amígdala y el hipocampo, se han encontrado niveles elevados de expresión de TRs en el adulto (Puymirat *et al.*, 1991), lo que puede contribuir a explicar la influencia de las HT en los mecanismo de acción de los antidepresivos en la depresión.

1.4.2.1 Alteraciones metabólicas por falta de hormonas tiroideas en el cerebro adulto

En el adulto, el efecto primario de las anomalías en los niveles de HT se manifiesta por alteraciones del metabolismo. Este efecto incluye cambios en el consumo de oxígeno y en el metabolismo de las proteínas, hidratos de carbono, grasas y vitaminas (Oppenheimer *et al.*, 1987). A pesar de las importantes acciones de las HT en el SNC, se sabe muy poco sobre la regulación específica por HT del metabolismo cerebral en el adulto. De hecho, todavía se sigue considerando en muchas revisiones y libros de texto que las HT en el adulto estimulan el consumo de oxígeno en casi todos los tejidos, excepto en el cerebro adulto.

Sin embargo, algunos estudios experimentales y clínicos indican que la deficiencia de HT en el adulto provoca alteraciones en el metabolismo energético del cerebro. Así, se ha descrito que en el hipotiroidismo adulto pueden alterarse actividades metabólicas como la Na⁺ K⁺ ATPasa y la acetil colinesterasa (Lindvall-Axelsson *et al.*, 1985), además de las concentraciones,

medidas con espectroscopía de resonancia magnética de ^{31}P , de distintos metabolitos energéticamente importantes, como fosfo-creatina (Smith & Ain, 1995).

Por otro lado, en animales de experimentación se ha señalado que el hipotiroidismo adulto provoca anomalías en el intercambio de glutamato, glutamina y GABA entre los compartimentos neuronal y glial (Chapa *et al.*, 1995). En este estudio se encontró un aumento de las concentraciones de glutamato y GABA en homogenados de cerebro completo. Estos resultados no tienen por que ser contradictorios con los obtenidos por otros grupos que muestran una disminución de los niveles de GABA en el hipotálamo y en el tálamo debidos al hipotiroidismo en el adulto (Upadhyaya & Agrawal, 1993), ya que puede deberse a una diferente regulación y regionalización de los niveles de GABA en el cerebro. Además, se ha encontrado que la deficiencia de HT no afecta igual a la enzima glutamato descarboxilasa, que produce GABA a partir glutamato, en todas las regiones cerebrales. Mientras que se produce una disminución tanto de la actividad como de la expresión en diferentes regiones de la corteza (visual, frontal y prefrontal), otras regiones como el cuerpo estriado no se ven alteradas por el hipotiroidismo (Kalaria & Prince, 1986; Virgili *et al.*, 1991).

2. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

2.1 Estructura de la formación hipocampal

La formación hipocampal es una estructura límbica cortical formada por el hipocampo y sus estructuras adyacentes: subículo, giro dentado (GD) y corteza entorrinal. La formación hipocampal está implicada en muchos procesos mentales, en particular en procesos de aprendizaje y la memoria y en el mantenimiento del estado de ánimo. Además presenta una gran plasticidad funcional y estructural.

El GD y el hipocampo son arquicortezas, es decir cortezas compuestas por sólo tres capas. Ambos presentan una única capa de somas neuronales densamente empaquetados entre dos capas de células dispersas.

Esta tesis se centra en el estudio de las acciones de las HT en el GD y el hipocampo de ratas adultas con distinto estado tiroideo. Estas regiones son diana de HT durante el desarrollo, pero también en el adulto (Rami *et al.*, 1986a; Rami *et al.*, 1986b; Gould *et al.*, 1991; Madeira *et al.*, 1991; Madeira *et al.*, 1992).

2.1.1 Anatomía del hipocampo en la rata adulta

La capa principal del hipocampo es la capa piramidal o asta de Amón (cornu Ammonis, CA). Esta capa agrupa los somas de las neuronas piramidales excitatorias y tiene 3 regiones: CA1, CA2 y CA3, con diferencias en el tamaño celular y el patrón de conectividad. El hipocampo se divide además en diferentes estratos, ordenados del más profundo al más superficial: *lacunosum-moleculare*, *radiatum*, *lucidum* (sólo presente en CA3), *pyramidale*, *oriens* y *alveus*.

Las células principales del hipocampo son las neuronas piramidales, que poseen largas dendritas basales y apicales. Las neuronas de CA1 tienen somas más pequeños y están más empaquetadas. En CA1 y CA2, las neuronas piramidales carecen de las espinas dendríticas típicas de CA3 y de sus aferencias musgosas provenientes del GD. Los axones de CA3 se ramifican extensamente y proyectan al hilus, CA3 y CA2 (vías asociativas), así como a CA1 (vía colateral de Shaffer). Los axones de CA1 también se ramifican mucho y proyectan dentro de la formación hipocampal (al subículo y corteza entorrinal) y a regiones más distantes (corteza perirrinal y frontal y septo).

En los *stratum pyramidale* y *oriens* se encuentran la mayoría de las células en cesto y candelabro. Estas células son interneuronas inhibitorias GABAérgicas que están implicadas en la modulación de la actividad eferente de las neuronas piramidales.

Las capas de células no piramidales del hipocampo contienen un número pequeño de neuronas. Estas neuronas tienen somas con diferentes morfologías y presentan distintos patrones de arborización dendrítica y axonal.

2.1.2 Anatomía del giro dentado en la rata adulta

La capa celular principal del GD es la capa de células granulares, que se dispone en forma de V tumbada. Se puede distinguir una hoja dorsal o suprapiramidal y una ventral o infrapiramidal. La capa granular engloba a la capa polimórfica o hilus y a su vez es rodeada por la capa molecular (Figura 3).

Las células granulares son la principales neuronas del GD. Sus dendritas se ramifican en la zona proximal al soma y atraviesan la capa molecular, recibiendo aferencias asociativas (ipsilaterales) y comisurales (contralaterales) en su parte proximal y aferencias de la vía perforante en la zona distal. Los axones de las células granulares se ramifican en el hilus, donde forman contactos sinápticos con interneuronas de la capa polimórfica y con las neuronas hilares. Además, los axones de las células granulares abandonan el GD y se extienden hasta CA3 atravesando el *stratum lucidum*. Estos axones, altamente ramificados, se denominan fibras musgosas. Las fibras musgosas forman sinapsis complejas con las células piramidales de CA3, que presentan unas espinas especiales, largas y muy ramificadas.

En el borde interno de la capa granular también se localizan células en cesto, que son interneuronas GABAérgicas inhibitorias. Estas células presentan un axón muy ramificado y confinado a la capa granular y son capaces de modular la actividad excitatoria simultáneamente de un elevado número de células granulares. En la capa molecular y en el hilus también se encuentran varios subtipos de interneuronas GABAérgicas.

2.1.3. Conexiones de la formación hipocampal

El hipocampo y el GD reciben sinapsis importantes de la corteza entorrinal, amígdala, tálamo, septo, hipotálamo y núcleos monoaminérgicos del tronco del encéfalo. Además reciben aferencias comisurales del hipocampo contralateral. No reciben aferencias de la corteza

sensorial primaria, pero sí aferencias sensoriales indirectamente a través de las cortezas asociativas.

Las conexiones de la formación hipocampal son principalmente unidireccionales y forman un bucle cerrado que se origina en la corteza entorrinal (Figura 3). En la corteza entorrinal converge la información de llegada, que proviene de las áreas asociativas, y la información de salida que devuelve la formación hipocampal.

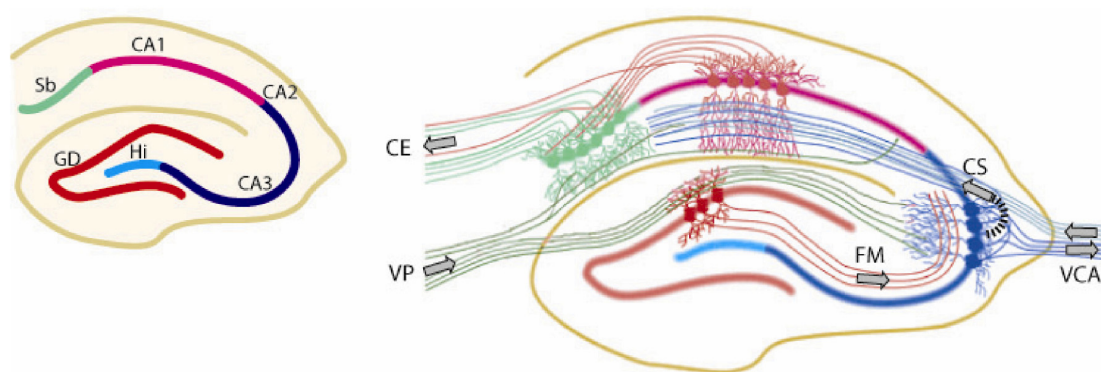


Figura 3. La formación del hipocampo y sus conexiones. A la izquierda, esquema de las diferentes regiones: GD, giro dentado; Hi, hilio; CA1-CA3, regiones del hipocampo; Sb, subículo. A la derecha, esquema de las principales proyecciones de la formación del hipocampo: VP, vía perforante; FM, fibras musgosas; CS, colaterales de Schaffer; VCA, vía comisural asociativa; CE, corteza entorrinal. Las flechas indican la direccionalidad de las conexiones.

La vía perforante es la aferencia principal a la formación hipocampal (Figura 3). Los axones de esta vía parten de la corteza entorrinal y contactan con las células granulares del GD y piramidales de CA3, principalmente, y también con neuronas piramidales de CA1 y del subículo. Las aferencias procedentes del septo, hipotálamo y tronco del encéfalo llegan a la formación hipocampal a través de la fimbria-fórnix (Vizi & Kiss, 1998).

La vía de las fibras musgosas se compone de los axones de las células granulares del GD. Estos axones contactan con las neuronas piramidales de CA3, constituyendo su aferencia principal. Muchas células granulares pueden hacer sinapsis con una sola célula piramidal de CA3.

Los axones de CA3 proyectan a CA1 tanto del hipocampo ipsilateral (vía colateral de Schaffer) como del contralateral (vía comisural asociativa).

La vía de CA1 al subículo y de allí a la corteza entorrinal representa la eferencia principal del hipocampo, pero no es una vía unidireccional ya que, como se ha explicado anteriormente, la corteza entorrinal también envía aferencias a CA1 y subículo.

En este circuito simplificado, habría que incluir las sinapsis entre las células principales y las interneuronas inhibitorias, las sinapsis asociativas entre células principales y las aferencias moduladoras del exterior del hipocampo.

2.2 Funciones de la formación hipocampal

2.2.1 Aprendizaje y memoria

2.2.1.1 Bases celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria

El sistema nervioso puede modificar continuamente su estructura y su dinámica como consecuencia de la actividad y la experiencia. El resultado de estos cambios es una adaptación del organismo al medio que se denomina plasticidad sináptica (Kolb, 1999). La plasticidad sináptica es, por tanto, la capacidad de las neuronas para modificar sus propiedades, así como los patrones de las conexiones que existen con otras neuronas.

Se cree que la experiencia de cualquier clase modifica el comportamiento subsiguiente, por lo menos en parte, a través de modificaciones duraderas de la fuerza sináptica de forma dependiente de actividad. El cerebro codifica acontecimientos externos e internos como patrones de actividad espacio-temporales complejos en un gran conjunto de neuronas que pueden ser conceptualizadas como “circuitos neuronales”. Una característica clave que define el comportamiento de un circuito neuronal dado es el patrón de peso o fuerza sináptica que conecta las neuronas individuales que componen un circuito. Una deducción de esta hipótesis es que la nueva información es almacenada (generación de memoria) cuando la actividad en un circuito causa un cambio duradero en el patrón de peso sináptico. Esta idea fue propuesta hace 100 años por Santiago Ramón y Cajal y fue estudiada con más profundidad por Donald Hebb a finales de los 40. Hebb propuso que las memorias asociativas se forman en el cerebro por un proceso de modificación sináptica en el que se consolidan conexiones cuando la actividad presináptica coincide con el disparo postsináptico (Hebb, 1949). Esta función propuesta para la plasticidad sináptica sugiere una base celular atractiva para fenómenos del comportamiento tales como el condicionamiento clásico pavloviano (Pavlov, 1927) en el cual la formación de

una memoria traza conlleva a la detección de dos acontecimientos coincidentes separados por un corto periodo de tiempo.

Como hemos visto, la sinapsis no es una estructura rígida sino que puede variar con los patrones de actividad cerebral. A nivel celular, la plasticidad es una modificación más o menos duradera de las propiedades electrofisiológicas de la neurona. Hasta principios de los años 70 no se demostró experimentalmente la existencia de tales cambios duraderos de la fuerza sináptica dependientes de la actividad. Estos estudios los realizaron Bliss y colaboradores (Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Bliss & Lomo, 1973) mostrando que la estimulación repetida de una sinapsis excitatoria con impulsos de alta frecuencia (HFS, del inglés High Frequency Stimulation) en el hipocampo causaba una potenciación de la fuerza sináptica que podía durar desde horas hasta días. Desde entonces, este fenómeno conocido como potenciación a largo plazo o LTP (de sus siglas en inglés, Long Term Potentiation) ha sido objeto de intenso estudio porque se cree que proporciona información importante para el entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares por los cuales se forman los distintos tipos de memoria (Martin *et al.*, 2000; Gruart *et al.*, 2006; Pastalkova *et al.*, 2006; Whitlock *et al.*, 2006). Actualmente está claro que la LTP hipocámpal es sólo una de varias formas de plasticidad sináptica de larga duración que existen en diferentes circuitos neuronales del cerebro de los mamíferos. Se ha establecido que la mayoría de las sinapsis que exhiben LTP también muestran depresión a largo plazo o LTD (de sus siglas en inglés, Long Term Depression). Este otro fenómeno causa una disminución en la fuerza sináptica tras la estimulación repetida con impulsos de baja frecuencia. Así, un concepto clave es que la fuerza sináptica en la sinapsis excitatoria es modificable bidireccionalmente por diferentes patrones de actividad (Citri & Malenka, 2008).

2.2.1.2 La formación hipocámpal en aprendizaje y memoria

Memoria: “facultad psíquica por medio de la cual se retiene y recuerda el pasado”. Diccionario de la lengua española de la Real Academia Española.

Se distinguen varios tipos de memoria. La memoria de trabajo es la capacidad de mantener y usar la información de forma transitoria. La memoria explícita o declarativa requiere el recuerdo consciente de hechos o eventos. La memoria implícita o no declarativa utiliza

estrategias o habilidades inconscientes. Estos tipos de memoria residen en regiones diferentes del cerebro.

La formación hipocampal es responsable de la consolidación de la memoria explícita, es decir, de la formación de memorias a largo plazo (Milner *et al.*, 1998). Esa información se transfiere después a la neocorteza, donde se almacena. Hay evidencias tanto experimentales como de pacientes con daños en la formación hipocampal que indican que esta estructura está implicada en la consolidación de la memoria explícita (Scoville & Milner, 1957; Mishkin & Appenzeller, 1987; Zola-Morgan *et al.*, 1994; Mishkin *et al.*, 1997). El término consolidación hace referencia al almacenamiento de la información. Para formar memorias duraderas se requiere la conversión de memorias cortas y lábiles en una traza duradera (Hebb, 1949). Se ha demostrado en varias especies que para que se produzca el paso de memoria a corto plazo a memoria a largo plazo se requiere la expresión de nuevas moléculas (Abel & Kandel, 1998; Milner *et al.*, 1998; Abel & Lattal, 2001).

También se ha podido comprobar que el estado emocional y motivacional es decisivo para la consolidación de la memoria (Aggleton, 1993). En esta relación entre motivación y memoria pueden estar implicadas las interacciones entre la formación hipocampal y la amígdala.

2.2.1.3 Implicaciones de las hormonas tiroideas en la plasticidad sináptica del hipocampo

El hipotiroidismo adulto produce un gran rango de alteraciones en el SNC como se describió brevemente en el apartado **1.4.2**, incluyendo alteraciones en el aprendizaje y memoria (Leentjens & Kappers, 1995; Capet *et al.*, 2000; del Ser Quijano *et al.*, 2000; Saravanan *et al.*, 2002; Roberts & Ladenson, 2004). Diversos estudios clínicos han mostrado daños cognitivos serios durante el hipotiroidismo, incluyendo la incapacidad de concentración, una memoria pobre para recordar eventos recientes y la incapacidad de calcular y comprender cuestiones complejas (Haggerty *et al.*, 1990; Mennemeier *et al.*, 1993; Leentjens & Kappers, 1995; Burmeister *et al.*, 2001; Samuels *et al.*, 2007). También se han descrito en ratas adultas tiroidectomizadas daños graves en el aprendizaje y la memoria tanto a corto como a largo plazo (Gerges & Alkadhi, 2004; Alzoubi *et al.*, 2006).

El tratamiento de reemplazo con tiroxina mejora la memoria en los sujetos con hipotiroidismo subclínico (Osterweil *et al.*, 1992; Monzani *et al.*, 1993; Jensovsky *et al.*, 2002), sin

embargo otros estudios clínicos muestran resultados variables y se cuestiona si la terapia de reemplazo hormonal restaura completamente los daños provocados por el hipotiroidismo en el aprendizaje y la memoria (Mennemeier *et al.*, 1993; Leentjens & Kappers, 1995; Capet *et al.*, 2000; Samuels *et al.*, 2007). Estos datos demuestran claramente que hacen falta más estudios para comprender la fisiopatología cerebral del hipotiroidismo adulto y la respuesta al tratamiento con terapias de reemplazo hormonal.

La LTP, como ya hemos comentado anteriormente, es una forma de plasticidad sináptica que actualmente está aceptada como un buen correlato celular del aprendizaje y la memoria (Bliss & Collingridge, 1993) y que por cuestiones éticas se ha caracterizado sólo en animales de experimentación. Dentro de la LTP podemos diferenciar entre una LTP temprana o E-LTP (que se produce hasta las 3 h de haberse aplicado el HFS) y una LTP tardía o L-LTP (que es la que se produce a partir de las 3h). Está bien estudiado que las proteínas quinasas son esenciales como intermediarios entre la inducción y/o el mantenimiento de la LTP/memoria. La E-LTP principalmente depende de la fosforilación de la calmodulina quinasa dependiente de Ca^{2+} o CaMKII (Malenka *et al.*, 1989), pero la L-LTP requiere nueva síntesis de proteínas por la activación de factores de transcripción, como por ejemplo la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP-cíclico (CREB). Los factores de transcripción se activan por quinasas entre las que se incluyen la proteína quinasa A (PKA; Abel *et al.*, 1997), proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK; Bozon *et al.*, 2003) y CaMKIV (Bito *et al.*, 1996). La activación neuronal tras la HFS produce un aumento de Ca^{2+} intracelular que activa CaMKIV y adenilato ciclasa que activa a su vez la PKA, que transmite la señal de activación de la ruta de las MAPKs (ERK1/2) que fosforilarán CREB, activando de esta manera un factor de transcripción esencial para la L-LTP (Kandel, 2001). En este sentido se ha demostrado que el hipotiroidismo adulto en ratas reduce los niveles de LTP, así como los niveles de las proteínas (medidas por Western-blot) CREB y ERK1/2 en la región CA1 del hipocampo, lo que se correlaciona con una disminución del aprendizaje espacial (medido con el test del laberinto acuático de brazos radiales de Morris). En este estudio, el tratamiento con T4 normalizó tanto el aprendizaje como los niveles de LTP y de estas proteínas importantes para dicho proceso (Alzoubi *et al.*, 2009). Anteriormente estos autores demostraron que el hipotiroidismo impedía una correcta LTP en la región CA1 en ratas anestesiadas y que la LTP en el GD no se veía modificada por el estado tiroideo de los animales (Gerges *et al.*, 2001).

2.2.2 Estado de ánimo: la depresión

2.2.2.1 La formación hipocampal en la depresión

La formación hipocampal tiene un papel indirecto sobre las emociones a través de su relación con la amígdala. Ambas forman parte del sistema límbico, que engloba áreas del encéfalo relacionadas con la emoción y las vías que las interconectan. El sistema límbico, además de influir sobre la emoción, lo hace sobre funciones cognitivas, especialmente la memoria.

La amígdala está implicada en la formación y consolidación de memorias emocionales y podría actuar como refuerzo de la adquisición y del almacenamiento de memorias en otras zonas del cerebro entre las que se incluyen el GD y el hipocampo (LeDoux, 1993; McGaugh *et al.*, 1996). Aunque la formación hipocampal no debe ser la única responsable de los síntomas observados en la depresión, parece jugar un papel central en la enfermedad depresiva probablemente por su elevada plasticidad.

En algunos estudios con pacientes con depresión, la pérdida de volumen hipocampal parece tener un significado funcional. Se han relacionado la depresión y la atrofia hipocampal con alteraciones de la memoria verbal, que es una forma de memoria explícita (Sheline *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que la depresión afecta a la memoria explícita sin afectar generalmente a la memoria implícita (Roediger & McDermott, 1992; Bazin *et al.*, 1994), ni a la memoria de trabajo (Zakzanis *et al.*, 1998; Harmer *et al.*, 2002).

También cambios del volumen del GD parecen tener consecuencias para las funciones cognitivas de la formación del hipocampo. En experimentos con roedores, el enriquecimiento del ambiente induce un aumento del volumen del GD que se acompaña de un mejor desarrollo de tareas de aprendizaje espacial (Kempermann *et al.*, 1997).

2.2.2.2 Implicaciones de las hormonas tiroideas

Aunque la patogénesis de la depresión no se conoce en profundidad y parece ser multifactorial y aunque los mecanismos subyacentes por los que el funcionamiento tiroideo participa en la modulación de la psicopatología del estado de ánimo no son del todo conocidos, hay al menos dos hipótesis que pueden explicar las causas de la depresión y el mecanismo de

acción de las HT en estos pacientes. Estas hipótesis no tienen por qué ser incompatibles y pueden ser complementarias.

Por un lado, se ha postulado la importancia de la deficiencia de serotonina cerebral en la depresión (Prange *et al.*, 1974) y se ha estudiado la acción de la T3 en la modulación de la concentración de serotonina intracerebral en estados depresivos (Kirkegaard & Faber, 1998). Se ha descrito que la serotonina cerebral disminuye en el hipotiroidismo (Savard *et al.*, 1984) y aumenta en el hipertiroidismo (Singhal *et al.*, 1975). En este caso, la administración de HT en pacientes depresivos produciría un aumento en la neurotransmisión serotoninérgica, ejerciendo un efecto antidepresivo. Estudios en animales de experimentación han demostrado que la densidad de transportadores específicos de serotonina en el núcleo del rafe (estructura formada por los cuerpos celulares de neuronas serotoninérgicas) no se ve afectada por el hipotiroidismo iniciado en el adulto (Mason *et al.*, 1987; Hong *et al.*, 1992). Existen pocos resultados y hay bastante controversia sobre el papel de las HT en la regulación de la liberación y recaptación de serotonina en las regiones diana de este neurotransmisor. Mientras que por un lado se muestra un aumento del receptor de serotonina 1A en el hipocampo inducido por el hipotiroidismo adulto (Tejani-Butt *et al.*, 1993), otros investigadores (Kulikov *et al.*, 1999) no han encontrado cambios en la localización de estos mismos receptores en el hipocampo de ratas hipotiroideas también en edades adultas, ambos estudios analizados por la unión de los receptores a análogos específicos marcados radiactivamente.

Por otro lado, se ha relacionado la depresión con la deficiencia cerebral de catecolaminas, especialmente norepinefrina (Schildkraut, 1965). Se ha propuesto que las HT pueden actuar modulando el número de receptores postsinápticos alfa y beta adrenérgicos (Whybrow & Prange, 1981; Rozanov & Dratman, 1996). En el hipotiroidismo, la disminución de receptores adrenérgicos podría explicar la hipoactividad neuronal y los efectos anímicos asociados. En depresión, el efecto beneficioso del tratamiento coadyuvante con HT podría explicarse también por la modulación al alza de la neurotransmisión catecolaminérgica.

Objetivos

Los antecedentes presentados en la introducción ponen de manifiesto que las hormonas tiroideas son importantes para el correcto funcionamiento del cerebro adulto y que su deficiencia puede provocar distintas anomalías en la estructura y las funciones dependientes de la formación hipocampal. Hay una aceptación bastante generalizada de la completa reversión de estas anomalías con un tratamiento de reemplazo hormonal adecuado. De hecho, hay protocolos clínicos establecidos en el tratamiento y seguimiento del cáncer diferenciado de tiroides en los que se provoca un hipotiroidismo corto y transitorio en el adulto como estrategia diagnóstica. Sin embargo, algunos estudios clínicos indican la existencia de alteraciones persistentes en las capacidades de aprendizaje y memoria en individuos hipotiroideos a pesar de haber sido tratados con un reemplazo hormonal que normaliza los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas.

Por todo lo expuesto, el objetivo principal de esta tesis es alcanzar un mayor entendimiento y comprensión de las alteraciones que puede provocar un periodo corto de hipotiroidismo en el cerebro adulto y determinar si las alteraciones observadas pueden normalizarse con un tratamiento de reemplazo hormonal.

Para ello, como objetivos concretos nos planteamos estudiar el efecto de un hipotiroidismo adulto transitorio sobre distintos aspectos estructurales y funcionales de la formación hipocampal en estadios adultos, utilizando como modelo experimental la rata.

- 1- Evaluar la capacidad auditiva mediante el estudio de potenciales evocados del tronco cerebral.
- 2- Evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria en la realización de una tarea dependiente de la formación hipocampal, el condicionamiento clásico del reflejo palpebral.
- 3- Estudiar distintos aspectos de la plasticidad sináptica de la vía perforante-giro dentado tanto en condiciones basales como durante el proceso de aprendizaje en animales despiertos y libres de movimiento.
- 4- Evaluar posibles alteraciones en los circuitos inhibitorios y excitatorios en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo analizando por inmunohistoquímica la expresión de diferentes proteínas características de los mismos.
- 5- Estudiar la abundancia de distintos metabolitos en la formación hipocampal mediante técnicas de espectroscopía de resonancia magnética de protón.
- 6- Estudiar la modulación dependiente de actividad de las concentraciones extracelulares de serotonina en la formación hipocampal por microdiálisis intracerebral.

Materiales y Métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas proporcionadas por el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, que se estabularon en grupos de 3 por jaula. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada (22-24 °C) y con ciclos alternativos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los animales se sometieron a control veterinario siguiendo las normas de la Unión Europea (86/609/EEC) según procedimientos aprobados por el comité ético de la institución.

Se utilizaron animales eutiroides (grupo E), hipotiroideos por tiroidectomía quirúrgica en el día postnatal 60 (P60; grupo H) e hipotiroideos tratados crónicamente con T3 y T4 como terapia de reemplazo hormonal (grupo de recuperación o R). Todos los estudios se realizaron en estadios adultos, en edades comprendidas entre P85 y P130 (Figura 4).

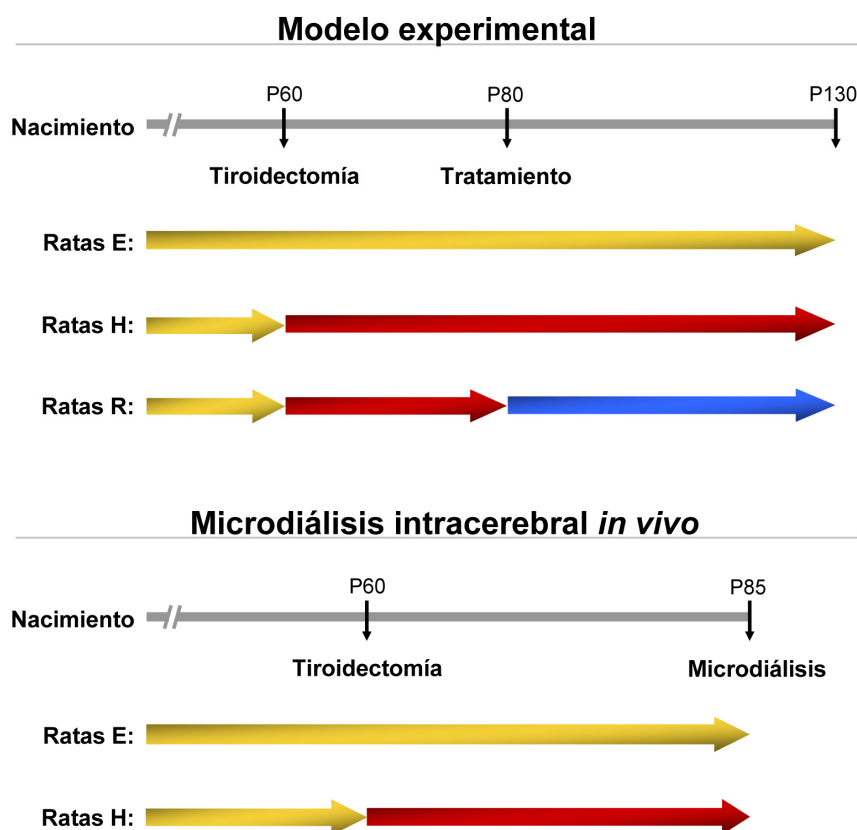


Figura 4. Modelo experimental. Se muestran los tres grupos de animales estudiados: eutiroides (E), hipotiroideos (H) e hipotiroideos con un tratamiento de HT (R). El periodo eutiroides de todos los animales se representa en amarillo, el hipotiroideo en rojo y el tratamiento con HT en azul. En todos los estudios la tiroidectomía quirúrgica se realizó a P60 y el tratamiento hormonal a P80, excepto en los estudios de microdiálisis intracerebral *in vivo* en el que sólo se incluyeron animales E y H a los 25 días de la tiroidectomía.

Cuando fue necesario, los animales se anestesiaron por inyección intraperitoneal (i.p.) con una mezcla anestésica de ketamina (5 mg / 100 g peso corporal; Imalgène 1000, Merial), medetomidina (0,01 mg / 100 g peso corporal; Domtor, Pfizer) y atropina (0,005 mg/100 g peso corporal, Braun). En el caso de la implantación de los electrodos los animales se anestesiaron por inyección i.p. de hidrato de cloral al 4% (0.5-1 ml/100 g peso corporal, Sigma) y atropina (0.1 mg/100 g peso corporal).

1.1 Tiroidectomía quirúrgica

La inducción del hipotiroidismo en el adulto se realizó a P60 en todos los animales mediante tiroidectomía quirúrgica. Los animales eutiroides sufrieron una intervención simulada. Todas las ratas tiroidectomizadas se alimentaron con una dieta baja en yodo desde el día de la intervención (Martínez-Galán *et al.*, 1997). Este protocolo produce una disminución en las concentraciones plasmáticas de T4 y T3, que alcanzan niveles mínimos aproximadamente 2 semanas después de la operación (Obregón *et al.*, 1981). La tiroidectomía detiene el crecimiento del animal, por lo que la variación del peso es un buen índice de su estado tiroideo. Por ello todos los animales se pesaron 2- 3 veces por semana desde el día de la tiroidectomía hasta el día del sacrificio.

La tiroidectomía se realizó bajo una lente de aumento para visualizar con claridad todas las estructuras, según el método descrito por Zarrow *et al.* (1964) con algunas modificaciones. Tras anestesiarse al animal por inyección i.p. con la mezcla anestésica, la zona ventral del cuello se afeitó y trató con antiséptico (clorhexidina al 0,5% en etanol 70%, Hibimax, AstraZeneca). Después se realizó una incisión a lo largo de la tráquea y se separaron los músculos a su alrededor. La glándula tiroidea consta de dos lóbulos situados a ambos lados de la parte medial de la tráquea. En las porciones posteriores de los lóbulos tiroideos se encuentran alojadas las glándulas paratiroides recubiertas de tejido conectivo. Estas estructuras son amarillentas y se distinguen del tejido tiroideo circundante que es más rojizo. Las paratiroides producen la hormona paratiroidea que regula los niveles sanguíneos de calcio. Para evitar problemas relacionados con el metabolismo del calcio, antes de extirpar los lóbulos tiroideos se extrajeron las paratiroides y se colocaron en el músculo cercano donde siguen siendo funcionales. Cada lóbulo tiroideo se disecó tirando de abajo arriba con unas pinzas quirúrgicas estériles. La eventual hemorragia se controló utilizando pequeñas bolas de algodón.

Con el fin de evitar problemas respiratorios e incluso la muerte del animal, se extremaron las precauciones para no dañar el nervio recurrente. Una vez terminada la tiroidectomía, se cosió la incisión con hilo de seda trenzada 3/0 (Suturas Aragón) y para el postoperatorio se colocó al animal en una jaula calentada con una manta eléctrica para evitar la posible hipotermia del animal. Las ratas se vigilaron hasta después de despertar de la anestesia.

1.2 Tratamiento crónico con hormonas tiroideas

El tratamiento de reemplazo hormonal (grupo R; Figura 4), se inició 20 días después de la tiroidectomía (P80), basándose en estudios previos (Escobar-Morreale *et al.*, 1996; Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006), y consistió en la administración de una mezcla fisiológica de T4 y T3 en el agua de bebida (0,18 µg T4/ml y 0,03 µg T3/ml; Sigma-Aldrich, Inc.). La concentración hormonal en el agua de bebida se calculó en base al volumen ingerido por los animales para dispensar 2,4 µg T4 y 0,4 µg T3 por 100 g de peso corporal por día. La solución se preparó diariamente en agua destilada con 0,01% de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich, Inc.) para evitar la degradación de las HT.

1.3 Sacrificio de los animales y obtención del tejido

El sacrificio de los animales se realizó por perfusión intracardíaca excepto en los animales utilizados para los estudios de resonancia magnética nuclear (ver apartado 8).

Los animales se anestesiaron por inyección i.p. con la mezcla anestésica. En estado de anestesia profunda, se practicó una incisión a lo largo de todo el abdomen y se apartaron los intestinos con objeto de visualizar la arteria aorta abdominal y su bifurcación en las ilíacas. Utilizando una aguja con heparina al 0,17% (Sigma-Aldrich, Inc.) se extrajeron 2 ml de sangre de esta arteria que posteriormente se clampó para evitar hemorragias. La sangre heparinizada se centrifugó y el plasma obtenido como sobrenadante se congeló hasta su uso para el análisis hormonal.

Tras abrir la caja torácica, el animal se perfundió vía aorta ascendente, primero con 50 ml de solución salina (NaCl 0,9%, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y después con una solución fijadora de paraformaldehído (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) al 4% tamponado

en tampón fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4. El volumen de solución fijadora utilizado en ml fue el mismo que el peso del animal en g.

Tras la perfusión, los animales se decapitaron y los cerebros extraídos se postfijaron por inmersión en la solución fijadora durante 24h a 4°C. Posteriormente los cerebros se lavaron en PB 0,1M y se almacenaron en PB 0,1M con azida sódica (Sigma-Aldrich, Inc.) al 0,05% (PB-azida) a 4°C.

El cerebro fijado se talló y el hipocampo dorsal (de -2.5 a -4.5 mm desde bregma) se seccionó seriado en 10 tubos para su posterior uso en los estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Se realizaron secciones coronales de 50 µm de grosor, utilizando un vibratomo (VT-1000S, Leica). Las secciones se recogieron en PB-azida y se almacenaron a 4°C.

1.4 Determinación de la concentración de hormonas tiroideas

La medida de las concentraciones de HT en el plasma de los animales para la caracterización de su estado tiroideo se realizó en colaboración con el grupo de los Profesores Gabriella Morreale de Escobar y Francisco Escobar del Rey y de la Profesora María Jesús Obregón, del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

1.4.1. Síntesis de T3 y T4 marcadas radiactivamente

Se sintetizaron T3 y T4 radiactivas de muy alta actividad específica (3000-1500 µCi/µg) para los ensayos posteriores de radioinmunoanálisis (RIA) utilizando [¹²⁵I]. También se sintetizaron HT radiactivas para utilizarlas como trazadores internos para poder estimar el porcentaje de recuperación de T3 y T4 en el proceso de extracción. En este caso la T3 se sintetizó con [¹²⁵I] y la T4 con [¹³¹I] para poder distinguirlas. La T4 marcada se sintetizó a partir de T3 y la T3 a partir de 3,5-T2, siguiendo el método descrito por Weeke y Orskov (Weeke & Orskov, 1973). El yoduro radiactivo utilizado se oxidó a yodo naciente mediante cloramina T y se incorporó en posición 5' ó 3' del grupo fenilo del sustrato. Los productos del marcaje se separaron por cromatografía en papel con butanol-metanol-amoniaco (Obregón *et al.*, 1978).

1.4.2. Extracción de T3 y T4 del plasma

Para la extracción y purificación de HT del plasma se siguió el protocolo descrito por Gordon *et al.* (1982) modificado por Morreale de Escobar *et al.* (1985) A las muestras de plasma se les añadió 2000 cpm de [¹³¹I]-T4 y 2000 cpm de [¹²⁵I]-T3 como trazadores internos y se extrajeron con metanol-cloroformo (1:2) en Cl₂Ca al 0,05%. La purificación de las HT de los extractos obtenidos se realizó por cromatografía de intercambio iónico en columnas de resina Dowex y posterior elución con ácido acético al 70%. La radiactividad de la fracción resultante se cuantificó con un contador gamma para calcular la recuperación individual de cada hormona en cada una de las muestras analizadas. Posteriormente se sometió a evaporación y se resuspendió en tampón de RIA (PB 0,04M pH8 con BSA al 0,2 % y mertiolato 0,6 mM). Este extracto se guardó congelado hasta su análisis posterior mediante RIA.

1.4.3. Determinación de T3 y T4 en extractos de plasma mediante radioinmunoanálisis

Para la realización del RIA se utilizó el método de Weeke y Orskov (Weeke & Orskov, 1975) modificado para tejido de rata (Obregón *et al.*, 1978; Morreale de Escobar *et al.*, 1985; Morreale de Escobar *et al.*, 1994), usando anticuerpos específicos (Ruiz de Oña *et al.*, 1991). Cada muestra se ensayó por duplicado y a dos diluciones diferentes de la muestra, añadiendo a cada ensayo 100 µl de tampón de RIA con 6000 cpm de [¹²⁵I]-T4 ó [¹²⁵I]-T3 y 100 µl del antisuero específico (en una dilución 1/300.000 para T4 y 1/150.000 para T3). Después de 12-24h de incubación, se añadieron 1,5 ml de tampón de RIA con 90 mg de polietilenglicol-6000 y 45 µl de suero bovino. Los complejos antígeno-anticuerpo se precipitaron por centrifugación y se contó la radiactividad del precipitado.

En cada ensayo se utilizaron curvas patrón de T4 (rango de 2,5 a 320pg) y T3 (rango de 1,5 a 100 pg) con límites de detección de 2,5 y 1,5 pg por tubo respectivamente. Las concentraciones de cada hormona en la muestra inicial se calcularon teniendo en cuenta la recuperación de los trazadores internos durante el proceso de extracción y el volumen de cada alícuota, y se expresaron en ng por ml de plasma.

2. ESTUDIO DE LOS POTENCIALES AUDITIVOS EVOCADOS DEL TRONCO CEREBRAL

Se analizó la respuesta auditiva de los 3 grupos experimentales (E, H y R) para evaluar si la tiroidectomía y/o el tratamiento alteraba la capacidad auditiva en los animales ya que para los estudios de aprendizaje y memoria se usa un tono como estímulo condicionado (ver apartado 4.2.1). Estos estudios se realizaron a P130 en 13 animales (5 E, 4 H y 4R), en el servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva (ENNI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

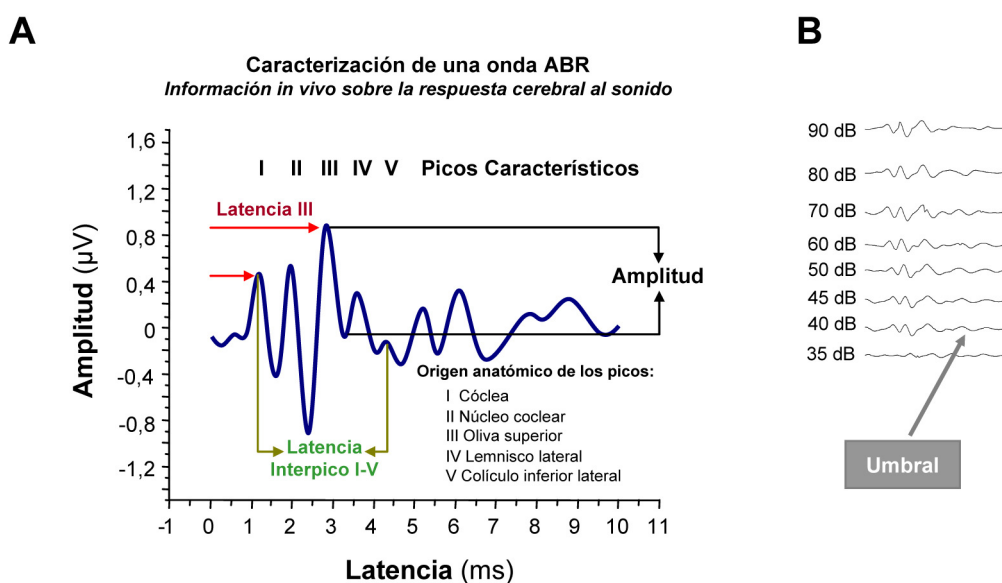


Figura 6. Potenciales auditivos evocados del tronco cerebral. **A.** Ejemplo esquemático de una gráfica de potencial auditivo evocado donde se aprecia cada uno de los picos pertenecientes a las diferentes estaciones nerviosas de la vía auditiva periférica y el tronco cerebral. **B.** Ejemplos de gráficas reales de potenciales auditivos evocados inducidos a diferentes intensidades para caracterizar el umbral auditivo de un animal.

Los animales fueron anestesiados vía i.p. con la mezcla de anestésicos. La prueba de ABR (de las siglas en inglés Auditory brainstem response) se llevó a cabo en una cámara insonorizada. Para analizar la respuesta auditiva se usó un sistema de estimulación y registro multifuncional TDT system 3 (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, EUA). Los electrodos de registro, de acero inoxidable, se colocaron en el vértex y en la parte ventrolateral de los oídos. Para la estimulación auditiva se utilizó un sonido tipo “click” a una velocidad de 30 pulsos por segundo. El “click” es un estímulo auditivo inespecífico compuesto por el espectro de frecuencias audibles que activa a todas las neuronas cocleares. Con esta prueba se determinó tanto el umbral auditivo como la velocidad de conducción del estímulo sonoro entre las

diferentes estaciones nerviosas de la vía auditiva periférica y el tronco cerebral, las latencias de los picos I (cóclea), II (núcleo coclear), III (oliva superior), IV (lemnisco lateral) y V (colículo inferior lateral) y las latencias interpico características de los animales de las tres condiciones experimentales (Figura 6; Cediel *et al.*, 2006).

3. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD SINÁPTICA Y DE APRENDIZAJE Y MEMORIA: CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DEL REFLEJO PALPEBRAL

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. José María Delgado y la Dra. Agnès Gruart en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla con el fin de evaluar posibles alteraciones en la actividad sináptica y en procesos de aprendizaje y memoria debidos a la deficiencia de HT en el adulto. También se evaluó la recuperación de las alteraciones observadas con un tratamiento de reemplazo hormonal.

3.1 Implante crónico de electrodos

Tanto para realizar los estudios de aprendizaje y memoria como para estudiar la actividad de la primera sinapsis de la vía más importante de entrada de información al hipocampo a través del GD, la vía perforante (VP), se realizó una cirugía de implantación crónica de electrodos en los animales de las tres condiciones experimentales: E, H y R. Se utilizaron un total de 30 animales, 10 de cada condición.

El implante de los electrodos se realizó en todos los animales entre P96 y P102 tras anestesia con hidrato de cloral al 4% (0.5-1 ml/100 g peso corporal, Sigma) y atropina (0.1 mg/100 g peso corporal) por inyección i.p. Todos los extremos libres de los electrodos fueron soldados a conectores macho libres que se fijaron al cráneo con la ayuda de cemento dental (Duralay).

Para poder analizar la tarea de aprendizaje asociativo a la que se sometió a los animales fue necesario implantar por un lado, dos electrodos de estimulación en la rama supraorbitaria del nervio trigémino izquierdo (este nervio controla la contracción/relajación del músculo orbicularis oculi, proporcionando el parpadeo) y por otro lado, dos electrodos de registro electromiográfico (EMG) que se insertaron en el propio orbicularis oculi (Figura 7A). Los

electrodos implantados no afectaron ni a la posición ni a la movilidad del párpado en ningún caso.

A su vez, para el análisis de la actividad sináptica en la sinapsis VP-GD, se implantaron dos electrodos trenzados de estimulación en las fibras axónicas de la VP que conectan la corteza entorrinal con el hipocampo a través del GD (AP -6,8; L -3,0; DV -2,0). Para registrar la actividad sináptica, se colocaron cuatro electrodos trenzados en la capa granular del GD (AP -3,6; L -1,2; DV -3,4; Figura 7).

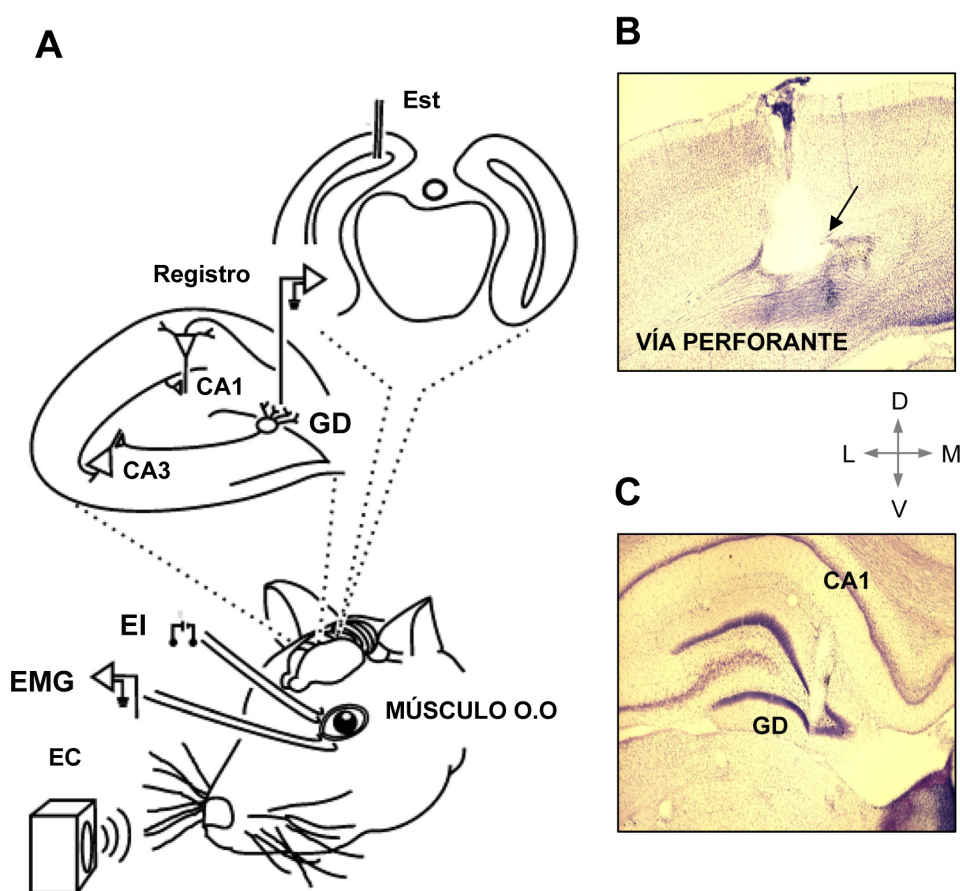


Figura 7. Posición del implante de los electrodos. (A) Los electrodos de registro EMG se implantaron en el músculo orbicularis oculi (O.O.) del párpado superior izquierdo. Para el condicionamiento traza palpebral se usó un tono como EC. Los electrodos de estimulación para producir el EI se implantaron en la rama supraorbitaria del nervio trigémino izquierdo. Para la activación sináptica durante el condicionamiento y para las demás pruebas electrofisiológicas, también se implantaron electrodos de estimulación (Est) en la VP y registro (Rec) en el GD. (B, C) Fotomicrografías ilustrando la posición de los electrodos de estimulación en la VP medial derecha (flecha en B) y la posición de los electrodos de registro para la actividad sináptica en la capa granular del GD derecho (flecha en C). Barra de calibración, 500 μ m. Abreviaturas: EC, estímulo condicionado; EI, estímulo incondicionado; VP, vía perforante; GD, giro dentado; O.O., orbicularis oculi; D, L, M y V, dorsal, lateral, medial y ventral.

Las coordenadas para los implantes intracraneales fueron obtenidas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1986). Las coordenadas DV, tanto para la estimulación como para el registro, fueron orientativas ya que la posición exacta se alcanzó por inspección visual de los potenciales de campo provocados por la estimulación con pulsos simples y monitorizados en el osciloscopio. La posición real de los electrodos se caracterizó en las secciones de tejido teñidas con la técnica de Nissl y analizadas con microscopía óptica (ver apartado 5).

3.2. Estudios de aprendizaje y memoria utilizando el condicionamiento clásico del reflejo palpebral

Para estudiar el posible efecto de la deficiencia de HT en el adulto en un proceso de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo se realizó un condicionamiento clásico del reflejo palpebral en ratas de los 3 grupos experimentales (E, H y R). Esta tarea es un aprendizaje de tipo asociativo o pavloviano en el que el animal aprende a asociar dos estímulos independientes, el estímulo incondicionado (EI) y el condicionado (EC), y una vez los asocia muestra una respuesta aprendida o respuesta condicionada.

3.2.1 Características específicas del condicionamiento clásico

El EC utilizado fue un tono de 50 ms de duración, 2.400 Hz de frecuencia y 85 dB de intensidad (Gruart *et al.*, 2006), producido por un altavoz que se colocó frente al animal a 30 cm de distancia (Figura 7A). Como EI se aplicó una descarga eléctrica de baja intensidad en el párpado del animal que se presentó 500 ms después del estímulo condicionado. La descarga eléctrica provocó el cierre del párpado proporcionando una respuesta refleja. La respuesta condicionada se consideró como el cierre del párpado tras la presentación del EC (tono) y previo al EI (descarga eléctrica). Tanto las respuestas reflejas como las respuestas condicionadas se registraron por actividad electromiográfica del músculo orbicularis oculi (Figura 7A).

3.2.2 Periodo de habituación

Tras la implantación quirúrgica de los electrodos se dejó que los animales se recuperasen durante unos 10 días. Pasado este tiempo se habituó a los animales durante 5 días tanto a la sala y caja de registro como a la conexión de los cables a los conectores de sus cabezas (Figura 8). Una vez los animales se habituaron al procedimiento, se les habituó al sonido, el EC, con una sesión diaria de habituación durante 2 días. En cada sesión de habituación se presentó 60 veces el EC, cada 30 ± 5 s, con una duración total de alrededor de 35 min por sesión y por animal. Durante este periodo se registraron las respuestas espontáneas que aparecían tras la aplicación del tono.

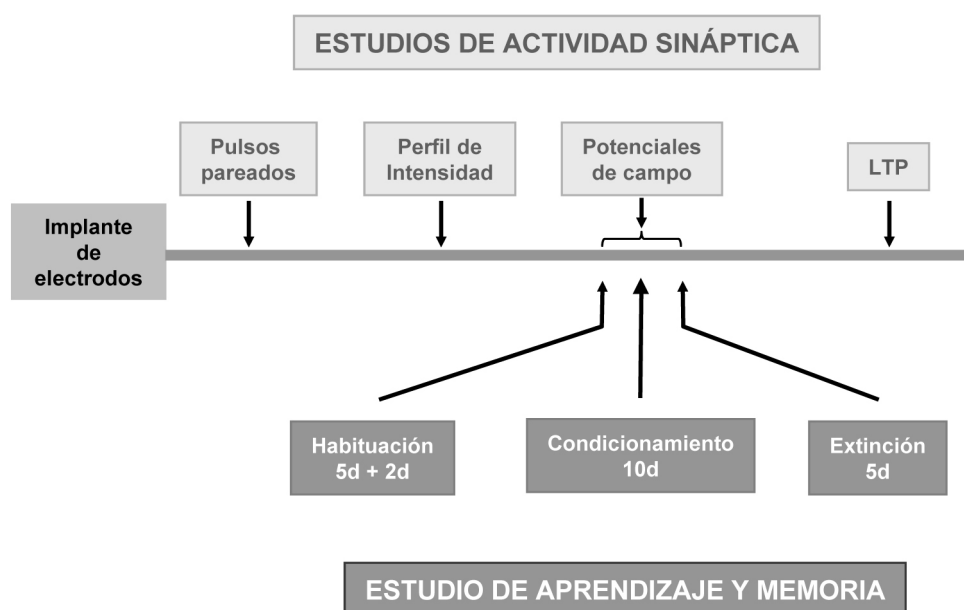


Figura 8. Esquema del desarrollo experimental en los estudios de actividad sináptica y de aprendizaje y memoria. En la parte superior se muestran los diferentes estudios electrofisiológicos realizados a los tres grupos experimentales desde el implante de los electrodos a P95 hasta el final de la LTP a P130. En la parte inferior se muestran los diferentes periodos del condicionamiento clásico para el estudio de aprendizaje y memoria, así como su duración en días.

3.2.3 Periodo de condicionamiento

Este periodo duró 10 días (Figura 8). Se realizó una sesión diaria por animal y el paradigma utilizado fue un paradigma de traza tono-descarga eléctrica separados en el tiempo 500 ms (Figura 9). En cada sesión de condicionamiento se presentó 60 veces la asociación EC-EI, también cada 30 ± 5 s. Tras varios días de condicionamiento, el animal aprende a asociar el EC

(tono) al EI (descarga eléctrica), con lo cual cierra el párpado al oír el tono antes de que aparezca la descarga eléctrica, realizando una respuesta condicionada o aprendida.

3.2.4 Periodo de extinción

Se realizó al terminar los 10 días de condicionamiento. Este periodo consistió en la repetición durante 5 días del protocolo utilizado en la habituación (Figura 8). En estas sesiones sólo se presentó a los animales el EC y se registró la evolución del número de respuestas condicionadas.

3.3 Estudios de la actividad sináptica

3.3.1 Estudio de los potenciales de campo durante el condicionamiento

El grupo de los Drs. Gruart y Delgado ha desarrollado una técnica que permite registrar, en animales despiertos, la capacidad de adquisición de un aprendizaje asociativo dependiente del hipocampo y, al mismo tiempo que los animales aprenden, las variaciones en la actividad sináptica de una sinapsis determinada. Por ello, se estudió si mientras los animales realizaban la tarea de aprendizaje asociativo existían modificaciones en la actividad de la sinapsis VP-GD. Para ello, se aplicó un pulso en la VP a los 300 ms del estímulo condicionado y se registró el potencial excitatorio de campo postsináptico (fEPSP, siglas en inglés de field Excitatory Post Synaptic Potencial), justo en el momento donde aparecen las respuestas condicionadas (Figura 9). La intensidad del pulso fue la correspondiente al 40% de la intensidad necesaria para provocar una máxima respuesta de la pendiente del fEPSP.

3.3.2 Prueba de pulsos pareados

Esta prueba se utilizó para examinar la modulación de la excitabilidad celular a corto plazo (Yorns *et al.*, 2004) y se basa en el registro de una segunda respuesta postsináptica (SRP) producida brevemente después de una primera respuesta postsináptica (PRP). La prueba consistió en la estimulación de la VP con pares de pulsos aplicados a diferentes intervalos de tiempo (10, 20, 40, 100, 200 y 500 ms; Figura 10). La intensidad de los estímulos presentados fue la correspondiente al 40% de la intensidad necesaria para provocar una máxima respuesta de la pendiente del fEPSP. En cada animal se registraron 10 pares de respuestas (PRP-SRP)

para cada intervalo interpulsos y el parámetro que se comparó fue la variación de la pendiente del fEPSP en ambos registros. El grado de facilitación o inhibición se expresó como la relación porcentual de la pendiente media de la SRP con respecto a la de la PRP.

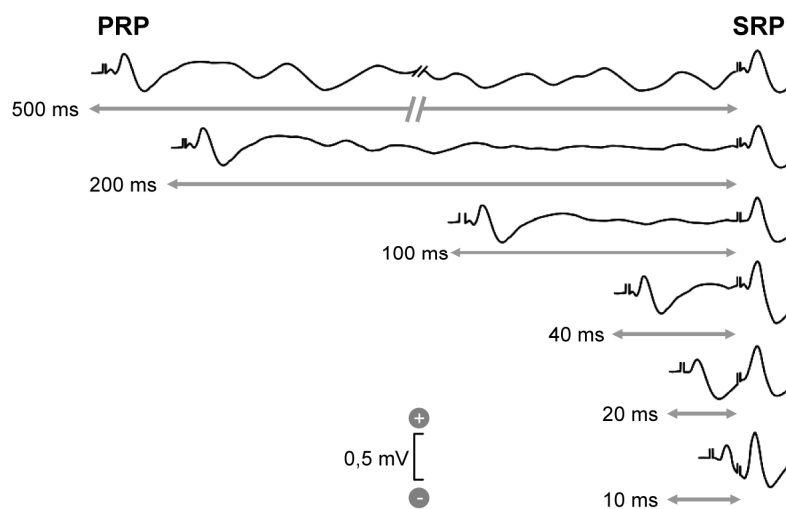


Figura 10. Pulsos pareados. Se muestra un ejemplo representativo del registro de los fEPSP promediados ($n=3$) recogidos en un animal control en la prueba de pulsos pareados. Abreviaturas: PRP, primera respuesta postsináptica; SRP, segunda respuesta postsináptica.

3.3.3 Perfil de intensidades

Con esta prueba se estudiaron los cambios en la pendiente de los fEPSP al ir incrementando paulatinamente la intensidad del estímulo, comprobando así la respuesta de la sinapsis VP-GD a las variaciones de intensidad. Para cada intensidad aplicada, el estímulo fue presentado más de 5 veces con un intervalo de tiempo superior a los 30 s para evitar posibles interferencias debidas a fenómenos de potenciación o depresión (Zucker & Regehr, 2002). El perfil de intensidades comenzó con valores subumbriles y se construyeron curvas estímulo/respuesta aplicando intensidades crecientes desde 0,04 mA hasta 0,3 mA.

3.3.4 Potenciación a largo plazo (LTP)

Actualmente se considera la LTP como el mecanismo molecular y celular de la memoria. Para caracterizar la LTP en los 3 grupos experimentales inicialmente se estableció un registro de línea base de 15 min con estímulos simples a una frecuencia de 0,2 Hz, y con una duración del pulso de 100 μ s. La intensidad del estímulo presentado fue la correspondiente al 40% de la intensidad necesaria para provocar una máxima respuesta de la pendiente de los fEPSP. Transcurrido este tiempo, se aplicó el protocolo de LTP que consistió en seis series de estimulaciones tetánicas, donde cada serie estaba compuesta de cinco trenes de pulsos a una velocidad de 1/s de una frecuencia de 200 Hz y una duración de 100 ms (protocolo de estimulación de alta frecuencia, HFS, de las siglas en inglés High Frequency Stimulation). El intervalo inter-series fue de 1 min. Posteriormente se volvió a la estimulación inicial y se registró durante 30 min. Esta estimulación inicial se repitió durante 15 min a las 24 y 48 h tras haberse realizado el protocolo de HFS (Figura 11). Para evitar cualquier interferencia con las pruebas de condicionamiento, la LTP se realizó 5 días después de la última sesión de extinción.

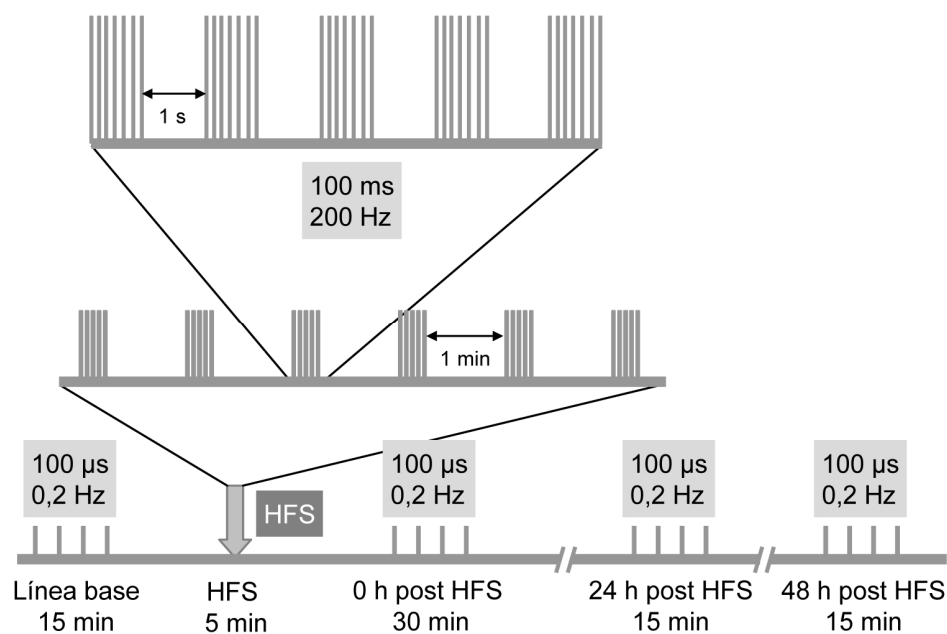


Figura 11. Procedimiento experimental de la LTP. Se muestra un esquema del protocolo de LTP utilizado. Se recoge la línea base durante 15 min aplicando pulsos simples de 100 μ s y 0,2 Hz. Después se aplica el HFS (6 series de cinco trenes de pulsos a una frecuencia de 200 Hz y una duración de 100 ms/pulso). A continuación se registra durante 30 min, y se registra de nuevo 24 h y 48 h después del HFS (durante 15 min) con pulsos simples similares a los aplicados para la línea base. Abreviaturas: HFS, estimulación de alta frecuencia.

4. TINCIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE NISSL

El estudio de la citoarquitectura del tejido con la tinción de Nissl nos permitió caracterizar la posición exacta del implante de los electrodos en la VP y en la capa granular del GD (véase Figura 7).

Las secciones de tejido de 50 μm se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire. El procedimiento utilizado fue el descrito por Noraberg (Noraberg *et al.*, 1999), con algunas modificaciones. Las preparaciones se sumergieron en etanol al 70% durante 12 h. Después se lavaron en agua dos veces durante 5 min, y se tiñeron con azul de toluidina al 0,1% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en una solución de Na_2HPO_4 al 1,4% (Riedel Haën) y ácido cítrico al 1,3% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) pH 4 durante 15 min. Tras lavar el exceso de colorante con agua, las preparaciones se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 90% y 99%) durante 2 min. Se clarificaron en xileno 5 min; se rehidrataron durante 2 min en etanol al 99% y al 96%, y finalmente en agua durante 5 min. Después se procedió a la tinción final de las secciones de tejido con azul de toluidina de nuevo durante 15 min, se aclararon con agua y se deshidrataron gradualmente (etanol al 50%, 70% y 96% durante 15 s, 30 s, y 1,5 min, respectivamente). La tinción se diferenció en etanol al 99%, según criterio propio. Después las secciones de tejido se clarificaron en xilol (2x10 min) y posteriormente se recubrieron con medio de montaje DePex (Serva).

La posición de los electrodos se analizó con el objetivo de 20X utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i.

5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para analizar posibles alteraciones en los circuitos inhibitorios o excitatorios de la formación hipocampal se estudió cualitativamente y cuantitativamente la expresión de diferentes proteínas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos (Tabla 1).

5.1 Procedimiento de inmunohistoquímica

Se utilizó una serie completa de secciones de cada animal (ver apartado 1.3) para estudiar la distribución y el número de las células y terminales inmunopositivos para cada anticuerpo utilizado.

La inmunohistoquímica se realizó en flotación según protocolos anteriormente descritos (Venero *et al.*, 2005). Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación, excepto cuando se especifican otras condiciones. Todas las secciones de tejido procesadas para un mismo anticuerpo se procesaron simultáneamente para minimizar las variaciones experimentales de inmunotinción.

Tras lavar las secciones extensivamente en PBS (tampón fosfato salino: tampón fosfato 0,05 M conteniendo NaCl al 0,9%, pH 7,4), se bloquearon las peroxidasas endógenas durante 15 min con metanol al 10% y H₂O₂ al 3% en PBS. Después de lavar esta solución, las secciones de tejido se incubaron durante 2 h en la solución de bloqueo (4% BSA y 0,1% tritón X-100 en PBS con 5% de suero de la especie del anticuerpo secundario y 0,1M lisina). Posteriormente se incubaron durante toda la noche, a 4°C con el anticuerpo primario (diluido en PBS con 4% BSA, 0,1% tritón y 1% de suero) y al día siguiente con el secundario biotinilado (diluido en PBS con 4% BSA, 0,1% tritón y 5% de suero) durante 1 h. Después de los lavados, las secciones se incubaron con avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite kit, Vector) en PBS con 0,1% tritón durante 1 h. El revelado del color se desarrolló por incubación en PBS con H₂O₂ al 0,01% y diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, Inc.) 0,5mg/ml, durante un tiempo variable en función del anticuerpo primario utilizado. Las secciones se montaron sobre portaobjetos gelatinizados con ayuda de pinceles y se secaron al aire. Las preparaciones se deshidrataron en etanol en porcentaje creciente, se aclararon en xilol y se cubrieron con DePex (Serva).

5.2 Análisis de la expresión de proteínas y anticuerpos utilizados

Se analizó la expresión de distintas proteínas con anticuerpos específicos (Tabla 1) en 5 secciones de tejido representativas del hipocampo dorsal de cada animal, todas pertenecientes a la misma serie. Se utilizaron 4 animales de cada condición experimental (E, H y R).

	Anticuerpos	Especie	Casa comercial	Dilución de uso
Primarios	PV	Ratón	Sigma	1:5000
	NR1	Conejo	BD Pharmingen	1:500
	GAT-1	Conejo	Abcam	1:750
	c-Fos	Conejo	Santa Cruz	1:1000
	DCX	Cabra	Santa Cruz	1:200
	PSD-95	Ratón	ABR	1:500
Secundarios	anti-ratón	Caballo	Vector	1:200
	anti-conejo	Cabra	Vector	1:200
	anti-cabra	Conejo	Vector	1:200

Tabla 1. Anticuerpos utilizados.

Para cuantificar la densidad de señal inmunohistoquímica de las proteínas de interés en cada una de las secciones se tomaron al azar 3 microfotografías a lo largo del *stratum pyramidale* de CA1 (del *stratum radiatum* en el caso de PSD-95) y otras 6 a lo largo de la capa granular del GD (en la capa molecular para PSD-95) con el objetivo de 60X (apertura numérica 0,85). Las microfotografías se adquirieron con una cámara Nikon DS-Fi1 incorporada al microscopio Nikon Eclipse 80i. La densidad de la señal inmunopositivas para cada proteína se cuantificó en áreas de 275 μm^2 (6 para el GD y 3 para CA1) con el software NIS Elements Br 3.0 (Nikon Corp.), tras convertir las imágenes a escala de grises. Se realizaron medidas similares en el cuerpo calloso para sustraer el fondo. En el caso de PV y para evitar interferencias, los cuerpos celulares de neuronas PV+ se excluyeron de la cuantificación.

La cuantificación de las células inmunopositivas para parvalbúmina (PV), c-Fos y doblecortina (DCX) en la capa granular del GD y las células PV+ en los *stratum oriens*, *pyramidale* y *radiatum* de CA1 se realizó siguiendo una versión modificada del principio del fraccionador (Williams & Rakic, 1988). Para evitar sesgos, cada sección de tejido se cuantificó sin conocer el

grupo experimental al que pertenecía. Las secciones se muestrearon sistemáticamente y se analizó toda la profundidad de cada sección. Para evitar sesgos por sobreestimación en el recuento, se excluyeron las células marcadas en el plano focal superior. El número total de células inmunopositivas se calculó multiplicando la suma de los valores obtenidos en cada sección por 6 (número de series que contenía la región analizada). Los recuentos se realizaron *de visu* directamente en un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i) a 40x (apertura numérica 0,75).

En todos los casos, las diferentes regiones del hipocampo se identificaron con la ayuda del atlas de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1986).

6. VOLUMEN DEL GIRO DENTADO

Para poder cuantificar el número absoluto de células, se realizó una estimación del volumen del GD del hipocampo según el método de Cavalieri (Mouton *et al.*, 1997) en las mismas secciones en las que se cuantificaron las células PV inmunopositivas. Para ello se utilizó una retícula de puntos con un área asociada al punto de 0,021 mm², donde se cuantificó el número total de impactos o puntos coincidentes con la región estudiada en las diferentes secciones.

7. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA DE PROTÓN

El estudio metabólico por resonancia magnética de protón se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en colaboración con el grupo de la Dra. Pilar López.

Para estudiar el perfil metabólico de los animales con distinto estado tiroideo (E, n=10; H, n=8; R, n=8), se llevó a cabo un estudio de espectroscopía de resonancia magnética de protón, más conocido por sus siglas en inglés HR-MAS (Proton High Resolution Magic Angle Spinning spectroscopy). El metabolismo cerebral se detuvo por desnaturalización de las proteínas del cerebro utilizando un microondas focalizado de 5 KW de intensidad y durante 2,3 s (Muromachi Kikai CO., LTD, Tokio, Japón). Tras extraer el cerebro, se disecó el hipocampo, del que se tomaron varias porciones de unos 10 mg de peso. El tejido se congeló en N₂ líquido hasta su análisis. El espectro de HR-MAS se obtuvo con un espectrómetro Bruker Avance de 11.7 Tesla y la adquisición se llevó a cabo a 4°C para evitar la degradación de la muestra. Finalmente el espectro se analizó automáticamente con el software LC-Model. Todas las

muestras se refirieron a la abundancia del metabolito N-acetil aspártico. Este metabolito se usa habitualmente como marcador de viabilidad neuronal ya que sus niveles sólo se alteran cuando existe daño neuronal (Moore & Galloway, 2002), por lo que presumimos que este metabolito es estable en nuestras condiciones de trabajo. Esta técnica es capaz de caracterizar todos los metabolitos que contengan ^1H en una concentración mínima para ser detectada (del orden de nM). En la figura 12 se muestra un espectro representativo y los metabolitos analizados en el experimento.

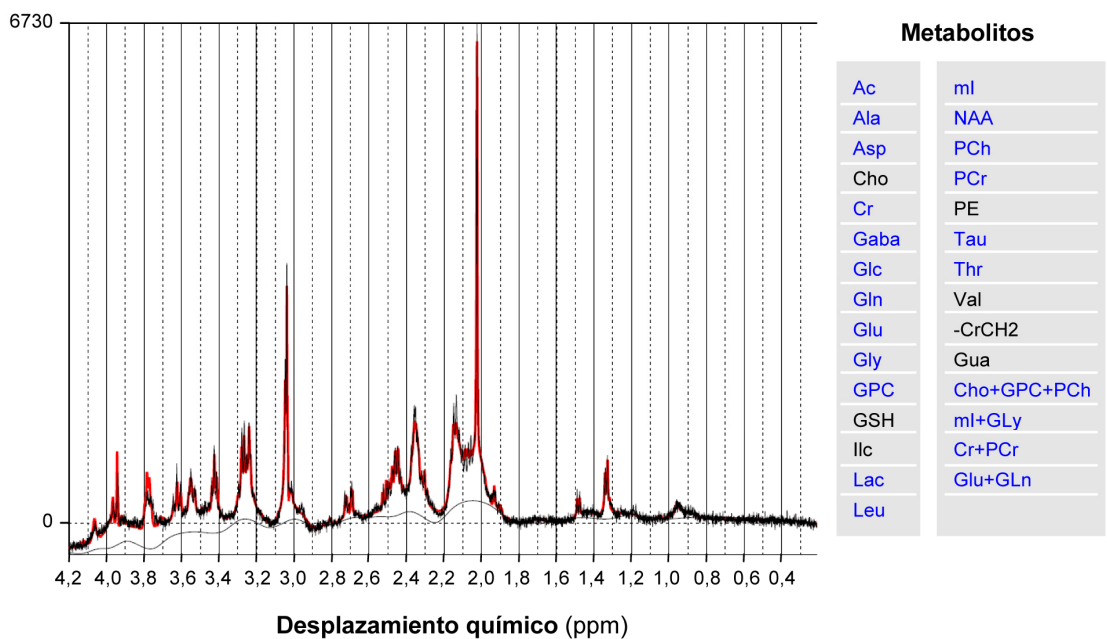


Figura 12. Metabolitos analizados por HR-MAS. En la parte de la izquierda se muestra un ejemplo de un espectro de HR-MAS obtenido de una muestra de hipocampo de un animal control (línea negra) y el ajuste automático que el programa LCD Model realiza (línea roja). La escala del espectro muestra el desplazamiento químico de los metabolitos de la muestra. A la derecha se muestra la tabla con los metabolitos analizados por el programa.

8. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE SEROTONINA EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL POR MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL *IN VIVO*

Este estudio fue realizado en colaboración con el grupo del Dr. Francesc Artigas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona con el fin de determinar si el estado

tiroideo influía en la modulación por actividad de las concentraciones extracelulares de serotonina en la formación hipocampal.

8.1 Construcción de las sondas de microdiálisis

Se construyeron las sondas para microdiálisis usando un tubo de acero inoxidable de 25G [0,51 mm diámetro externo (DE) y 0,33 mm diámetro interno (DI); A-M Systems, Carlsborg, WA, EUA] de 2 cm de longitud. A través de este tubo se insertaron dos tubos de sílica capilar fundida de 0.11 mm DE y 0.04 mm DI (Composite Metal Services Ltd, The Chase, Hallow, Reino Unido), uno para la infusión y otro para la recogida de muestras. En un extremo de estos tubos, se colocó la membrana de diálisis Cuprophane (Gambro, Lund, Suecia) que es una fibra vacía de celulosa regenerada (0.25 mm DE, 0.22 mm DI) con un tamaño de poro que permite el paso de moléculas de peso inferior a 5000 daltons. Tanto el extremo de la membrana como la zona de unión al tubo de acero se sellaron con Loctite® gel. La longitud total de la membrana expuesta al tejido fue de 1,5 mm. (Adell & Artigas, 1998). El otro extremo del tubo de sílica capilar se conectó el día del experimento a la bomba de microdiálisis.

8.2 Implante de las sondas de microdiálisis

Para realizar este experimento se utilizaron un total de 12 animales, 6 ratas E y 6 ratas H a los 25 días tras la tiroidectomía (P85 al iniciar los estudios). Las ratas fueron anestesiadas vía i.p. con la mezcla de anestésicos y posteriormente colocadas en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) para la implantación de la sonda de microdiálisis en el hipocampo dorsal. Las coordenadas estereotáxicas se calcularon según el atlas de anatomía del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1986), tomando el bregma como referencia para las coordenadas antero-posterior (AP) y lateral (L) y la duramadre para la coordenada dorso-ventral o DV (AP -3.8; L -1.8; DV -4.2, en mm). Se practicó una perforación para el implante de la sonda y 3 perforaciones más para los tornillos que la sujetan. Una vez colocada la sonda de microdiálisis en las coordenadas correctas se fijó todo el sistema utilizando cemento dental (Kerr® TAB 2000). Tras este procedimiento, los animales fueron estabulados individualmente con agua y comida *ad libitum*.

8.3 Obtención de muestras

Transcurridas 24 h desde la cirugía, se procedió a la conexión de las sondas a la bomba de microdiálisis (Harvard Apparatus Syringe infusion Pump 22, EUA) y a la perfusión del líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial, cuya composición fisiológica e isotónica es similar a la composición endógena: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.18 mM MgCl₂, 1.26 mM CaCl₂, a un pH de 6.5. Los tubos que conectan la sonda a la bomba de microdiálisis son lo suficientemente largos como para que el animal tenga libre movimiento y no se desconecte de la máquina de microdiálisis.

El LCR artificial se perfundió a un flujo de 1.65 µl/min. La salida de este sistema se conectó a unos tubos colectores donde se recogieron las muestras dializadas (viales de polietileno con tapón con capacidad para 250 µl, Elkay Products Inc., Shrewsbury, MA, EUA). Cuando todo el sistema estuvo lleno del líquido de perfusión, se esperó a su estabilización (aproximadamente 2 h) y a partir de entonces se comenzaron a recoger muestras cada 20 min con un volumen de 30 µl por fracción (Figura 5). De las primeras fracciones recogidas se utilizaron las más estables para el cálculo de los valores basales de los niveles de serotonina en hipocampo. Un experimento de diálisis completo contenía de 18 a 19 fracciones. Todos los estudios para cada animal se realizaron en 2 días consecutivos

8.4 Administración de fármacos

Como se indica arriba, de las primeras 6 fracciones recogidas se utilizaron las 4 más estables para el cálculo de los valores basales de los niveles de serotonina en hipocampo. Tras recoger los niveles basales de serotonina se añadió el primer fármaco al LCR artificial, veratridina (Sigma/RBI, St Louis, MO, EUA) 50 µM durante 20 min (Figura 5). La veratridina provoca la despolarización neuronal de forma local en la región hipocampal que se está perfundiendo. La despolarización produce una liberación masiva de neurotransmisores, lo que provoca un aumento de los niveles de serotonina en esta región. Con esta estrategia se quiere evaluar la influencia del hipotiroidismo en la modulación de la liberación de serotonina tras una despolarización inespecífica en el hipocampo dorsal de la rata. Se recogieron otras 6 fracciones durante 2 h. Pasado este tiempo, el sistema vuelve a encontrarse en los niveles basales de serotonina. En ese momento se inhibió la recaptación de este neurotransmisor por las terminales presinápticas durante las siguientes 2 h por la adición al LCR artificial del fármaco

citalopram 1 μ M (H Lundbeck A/S, Copenhagen-Valby, Dinamarca) y en este tiempo se recogieron las últimas 6 fracciones del experimento (Figura 5). Este ensayo se utiliza para determinar la influencia del hipotiroidismo sobre la variación de los niveles de serotonina en hipocampo dorsal provocada por la inhibición específica de la recaptación de este neurotransmisor.

Al día siguiente se realizó otro experimento en el que se estudiaron los niveles de serotonina en el hipocampo tras la inhibición de la liberación presináptica de serotonina. Con este experimento se quiere evaluar si el hipotiroidismo interfiere en la respuesta del sistema frente a la inhibición de la liberación de serotonina por la activación de los autorreceptores 1A. Las neuronas serotoninérgicas se encuentran en el núcleo del rafe desde donde proyectan a la corteza cerebral, incluyendo el hipocampo, y distintas regiones subcorticales. La aplicación sistémica por inyección subcutánea de un agonista de la serotonina como es el fármaco 8-OH-DPAT (RBI, Natick, MA, EUA) produce una disminución de la liberación de este neurotransmisor. Este agonista se une de forma específica al autorreceptor 1A de serotonina que actúa como sensor de los niveles de serotonina y que está presente mayoritariamente en las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe. En este experimento se utilizaron dos concentraciones de 8-OH-DPAT (0,1 y 0,3 mg/Kg, Figura 5). Tras recoger los niveles basales de serotonina durante 1 h (se recogieron 3 fracciones), se inyectó 0,1 mg/Kg del agonista y se recogieron 8 nuevas fracciones cada 20 min. Pasado este tiempo, se inyectó otra dosis de 8-OH-DPAT, esta vez de 0,3 mg/Kg y se recogieron otras 8 fracciones. Para estudiar mejor la disminución de serotonina en el hipocampo dorsal de las ratas debida al 8-OH-DPAT, se adicionó desde el principio al LCR artificial citalopram 1 μ M con el fin de aumentar los niveles extracelulares de serotonina en el hipocampo por inhibición de su recaptación.

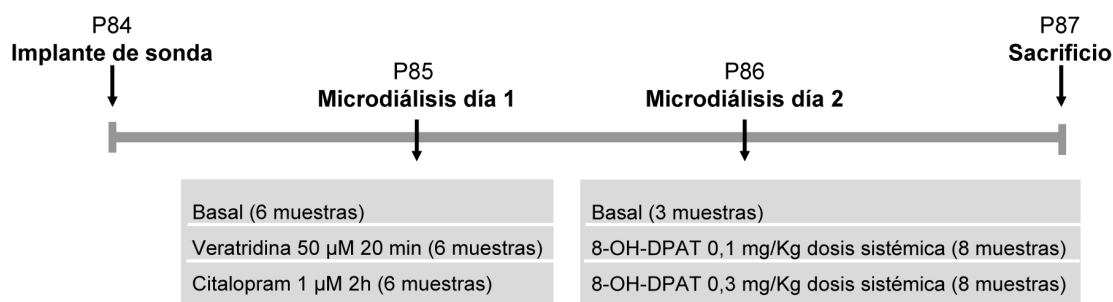


Figura 5. Esquema del procedimiento experimental de microdialísis intracerebral *in vivo*. Se muestra el tratamiento farmacológico administrado cada día y el número de muestras obtenidas cada 20 min con cada uno de los tratamientos.

8.5 Análisis de las muestras obtenidas

La concentración de serotonina en las muestras recogidas se analizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando un inyector automático Waters 717plus (Waters Cromatografía, Cerdanyola, España) y un detector electroquímico Hewlett-Packard 1049 (Agilent Technologies) según el método descrito en Adell y Artigas (Adell & Artigas, 1998).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar o la desviación estándar según se indique en cada caso. El nivel de significación estadística se estableció cuando $P \leq 0,05$. Las comparaciones estadísticas entre grupos y edades se realizaron con el programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para establecer comparaciones entre 2 grupos o edades se utilizó la prueba T de Student y entre 3 grupos el análisis de varianza (ANOVA) de una vía o el modelo mixto de ANOVA (con las secciones de tejido como medidas repetidas), excepto para los datos de las medidas electrofisiológicas que se analizaron usando el test de ANOVA de dos vías (con el tiempo o las sesiones como medidas repetidas). Cuando el ANOVA indicó un efecto significativo del factor estado tiroideo, se realizaron análisis *a posteriori* apropiados (de Bonferroni o Tamhane). Cuando el ANOVA indicó diferencias al borde de la significación estadística, se realizaron análisis de anidamiento (Nested). También se realizaron estudios de análisis de regresión cuando se indica.

Resultados

1. GRUPOS EXPERIMENTALES

En esta tesis se utilizaron varias tandas de animales para la realización de los diferentes estudios (Tabla 2).

- Tanda 1 (E= 10, H= 10 y R= 10): estudios de potenciales evocados del tronco del encéfalo, aprendizaje, actividad sináptica e inmunohistoquímica.
- Tanda 2 (E= 10, H= 9 y R= 8): estudios de resonancia magnética de protón (HR-MAS).
- Tanda 3 (E= 6, H= 6): estudio de los niveles extracelulares de serotonina por microdiálisis intracerebral.

En todas las tandas la tiroidectomía se realizó a P60. Los animales del grupo R comenzaron su tratamiento a partir de P80. Los animales se sacrificaron a P140 (tandas 1 y 2) o P85 (tanda 3).

1.1 Caracterización del estado tiroideo de los animales

1.1.1 Ganancia de peso corporal

La evaluación de la ganancia de peso corporal con el tiempo es una buena indicación del estado tiroideo del animal. La parada o ralentización en la ganancia del peso corporal es un parámetro indicativo de la efectividad de la inducción del hipotiroidismo por la tiroidectomía quirúrgica. Por el contrario, el aumento en la ganancia de peso indica la efectividad del tratamiento hormonal. Por ello, se realizó un seguimiento bisemanal del peso corporal de todos los animales desde la tiroidectomía hasta el sacrificio.

Los resultados obtenidos (mediante ANOVA para las tandas 1 y 2 y con t de Student para la tanda 3) mostraron en todos los casos diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los distintos grupos de animales ($P < 0.001$). Tanto los animales del grupo E como los R presentaron un porcentaje de ganancia de peso significativamente mayor que el de los animales H ($P < 0.001$ en todos los casos; Tabla 2).

El día del sacrificio, los animales del grupo E mostraron un aumento significativo en el peso corporal desde la operación simulada ($P < 0.001$ en todos los casos). Sin embargo, los animales H no mostraron diferencias significativas en la ganancia de peso a P140 (tanda 1, $P = 0,402$; tanda 2, $P = 0,315$), e incluso a P85 presentaron una pérdida significativa de peso (tanda

3, $P=0,007$). Los animales del grupo R, al igual que los animales del grupo E, presentaron un aumento significativo en el peso corporal desde la operación simulada ($P<0,001$ en todos los casos). Únicamente en la tanda 1 los animales R mostraron una pequeña diferencia significativa en la ganancia de peso con los animales del grupo E, debido a que el traslado de los animales se realizó durante el periodo de hipotiroidismo. Estos resultados indican que el tratamiento de reemplazo hormonal fue efectivo.

Tanda	Edad	Grupo	Ganancia peso (%)	T3 plasma (ng/ml)	T4 plasma (ng/ml)
1	P60-P140	E	177,0 ± 22,2	-	15,78 ± 3,48
		H	102,7 ± 6,4 ***	-	0,86 ± 0,58 ***
		R	156,9 ± 10,1 *	-	13,14 ± 6,17 ns
2	P60-P140	E	176,8 ± 21,7	0,58 ± 0,14	19,48 ± 4,59
		H	104,9 ± 6,9 ***	0,17 ± 0,07 ***	0,49 ± 0,25 ***
		R	159,1 ± 11,0 ns	0,61 ± 0,12 ns	17,59 ± 2,27 ns
3	P60-P85	E	119,4 ± 5,6	0,52 ± 13	29,33 ± 4,60
		H	89,2 ± 8,8 ***	0,08 ± 0,01 ***	0,40 ± 0,37 ***

Tabla 2. Ganancia de peso corporal y niveles de HT en los distintos grupos de animales (E, H y R). Diferencias respecto al grupo E: * $P<0,05$; *** $P<0,001$; ns: no significativo.

1.1.2 Concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas

Los resultados obtenidos (mediante ANOVA para las tandas 1 y 2 y con t de Student para la tanda 3) mostraron en todos los casos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de T3 y T4 plasmáticas entre los distintos grupos de animales ($P<0,001$).

Todos los animales H presentaron unos niveles muy bajos de T4 y T3 plasmáticas comparados con los animales de los grupos E y R ($P<0,001$ en todos los casos; Tabla 2), lo que caracteriza el estado hipotiroideo.

Los niveles de T3 y T4 en los animales R no presentaron diferencias significativas al ser comparados con los niveles de los animales E ($P\geq 0,272$), lo que indica que el tratamiento de

reemplazo hormonal utilizado recuperó los niveles hormonales, como se había descrito previamente (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006).

2. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA CAPACIDAD AUDITIVA

Es bien conocido que el hipotiroidismo durante el desarrollo, tanto en animales como en humanos, provoca una pérdida funcional de audición (Deol, 1973; Rovet *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha descrito si esta pérdida auditiva puede producirse tras un periodo de deficiencia de HT en ratas adultas. Para analizar si el estado tiroideo podía influir en la capacidad auditiva de los animales y por tanto, en el desarrollo de la tarea de condicionamiento clásico, se evaluó la capacidad auditiva de los tres grupos experimentales realizando un estudio de potenciales auditivos evocados (ABR). Se midió el umbral auditivo y la velocidad de conducción del estímulo sonoro a través de los distintos núcleos auditivos.

El análisis de los umbrales auditivos con el ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas debidas al estado tiroideo de los animales ($F_{2,10} = 0,215$, $P = 0,810$; Figura 13): grupo E ($38,0 \pm 2,7$ dB), grupo H ($37,5 \pm 2,9$ dB) y grupo R ($38,8 \pm 2,5$ dB). Tampoco se observaron diferencias significativas debidas al estado tiroideo al estudiar la velocidad de conducción entre los diferentes núcleos auditivos como muestran las gráficas de latencia ($P \geq 0,081$) y de latencias interpicos ($P \geq 0,051$; Figura 13).

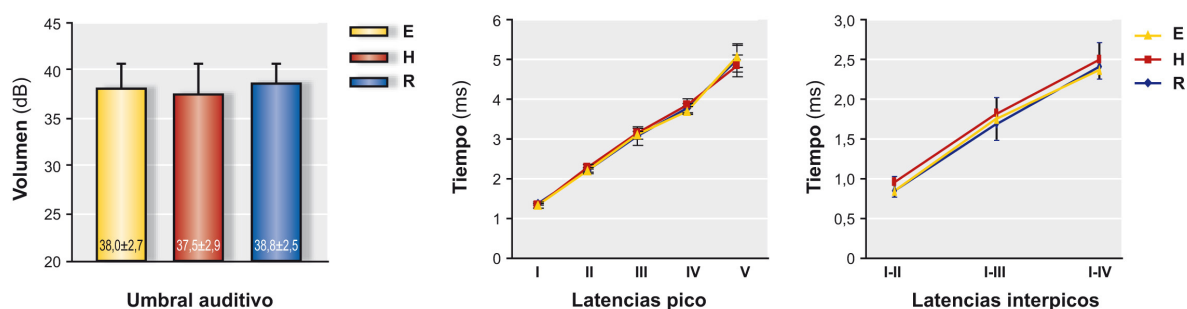


Figura 13. Estudio de potenciales auditivos evocados del tronco del encéfalo. (A) Caracterización del umbral mínimo auditivo en los tres grupos de animales. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($P \geq 0,810$). (B) Latencias pico de cada uno de los núcleos auditivos (I, cóclea; II, núcleo coclear; III, oliva superior; IV, lemnisco lateral; V, colículo inferior lateral). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales ($P \geq 0,081$). (C) Latencias interpicos características de los núcleos auditivos. No se observaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en los diferentes grupos de animales ($P \geq 0,051$). Se representa la media \pm SD.

De los resultados obtenidos podemos concluir que la deficiencia de HT en ratas adultas no modifica su capacidad auditiva, por lo que se pueden realizar los estudios de aprendizaje y memoria utilizando un estímulo sonoro de 85 dB para el condicionamiento.

3. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE

Se evaluó la capacidad de aprendizaje de los animales en un ejercicio de aprendizaje asociativo típico: el condicionamiento clásico del reflejo palpebral. Se utilizó un paradigma de traza en el que el estímulo condicionado (EC, tono) estaba separado del estímulo incondicionado (EI, descarga eléctrica en el párpado) un intervalo de tiempo de 500 ms.

Durante el periodo de habituación los 3 grupos de animales mostraron un número similar de respuestas espontáneas (Figura 14).

Durante el periodo de condicionamiento el porcentaje de respuestas condicionadas de los animales E (Figura 14, círculos negros) aumentó paulatinamente a lo largo de las sesiones, llegando a ser significativamente diferente de los valores obtenidos en la habituación desde la tercera hasta la décima sesión de condicionamiento y durante todas las sesiones de extinción ($P \leq 0,001$), con un perfil similar al descrito previamente en esta especie animal usando el mismo procedimiento de condicionamiento (Valenzuela-Harrington *et al.*, 2007). El grupo R (Figura 14, triángulos blancos) alcanzó porcentajes de respuestas condicionadas a lo largo del condicionamiento y durante la extinción similares a los valores obtenidos por el grupo E (70%; $P \geq 0,354$). Sin embargo, el grupo H (Figura 14, triángulos negros) presentó un aumento inicial en el porcentaje de respuestas condicionadas que alcanzó valores asintóticos del 30-35%, significativamente menores que los valores alcanzados por los animales de los grupos E y R ($P < 0,001$) desde la sexta a la décima sesión de condicionamiento y para la primera sesión de extinción.

En resumen, los animales del grupo H fueron incapaces de alcanzar los mismos porcentajes de respuestas condicionadas que los animales E, a diferencia del grupo R que sí lo hizo. De estos experimentos podemos concluir que la deficiencia de HT en el adulto impide la adquisición de un correcto aprendizaje de tipo asociativo dependiente del hipocampo y que el tratamiento de reemplazo hormonal utilizado es capaz de recuperar este defecto del aprendizaje.

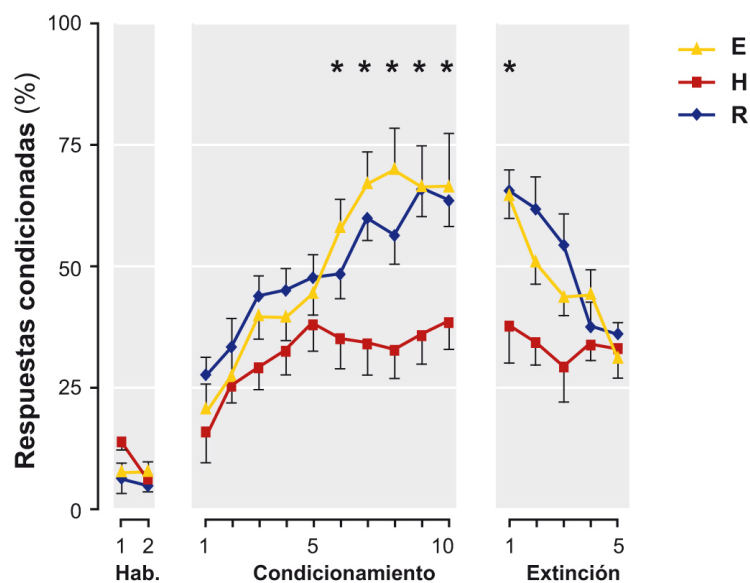


Figura 14. Curvas de aprendizaje en el condicionamiento clásico del reflejo palpebral de los tres grupos de animales. Se representa el porcentaje de respuestas espontáneas durante la habituación y respuestas condicionadas durante las sucesivas sesiones de condicionamiento y extinción de los animales E, H y R. Los datos representados corresponden a la media \pm error de los valores recogidos de $n=10$ animales/grupo. *, indica diferencias significativas ($P \leq 0,001$) entre los animales H y los otros dos grupos (E y R).

4. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DURANTE EL APRENDIZAJE

Durante la tarea de condicionamiento clásico del reflejo palpebral se estudió la evolución de los fEPSP en la sinapsis VP-GD. Esta sinapsis es la primera en la principal vía de entrada de información aferente al hipocampo y conecta la corteza entorrinal con el hipocampo.

Para realizar estos estudios se aplicó una estimulación eléctrica en la VP 300 ms después de la presentación del estímulo condicionado (EC) provocando un fEPSP en el GD en los 3 grupos de animales. Aunque el estímulo aplicado en la VP interrumpió el ritmo theta característico del hipocampo, este ritmo reapareció en fase unos 300 ms después (Figura 15A).

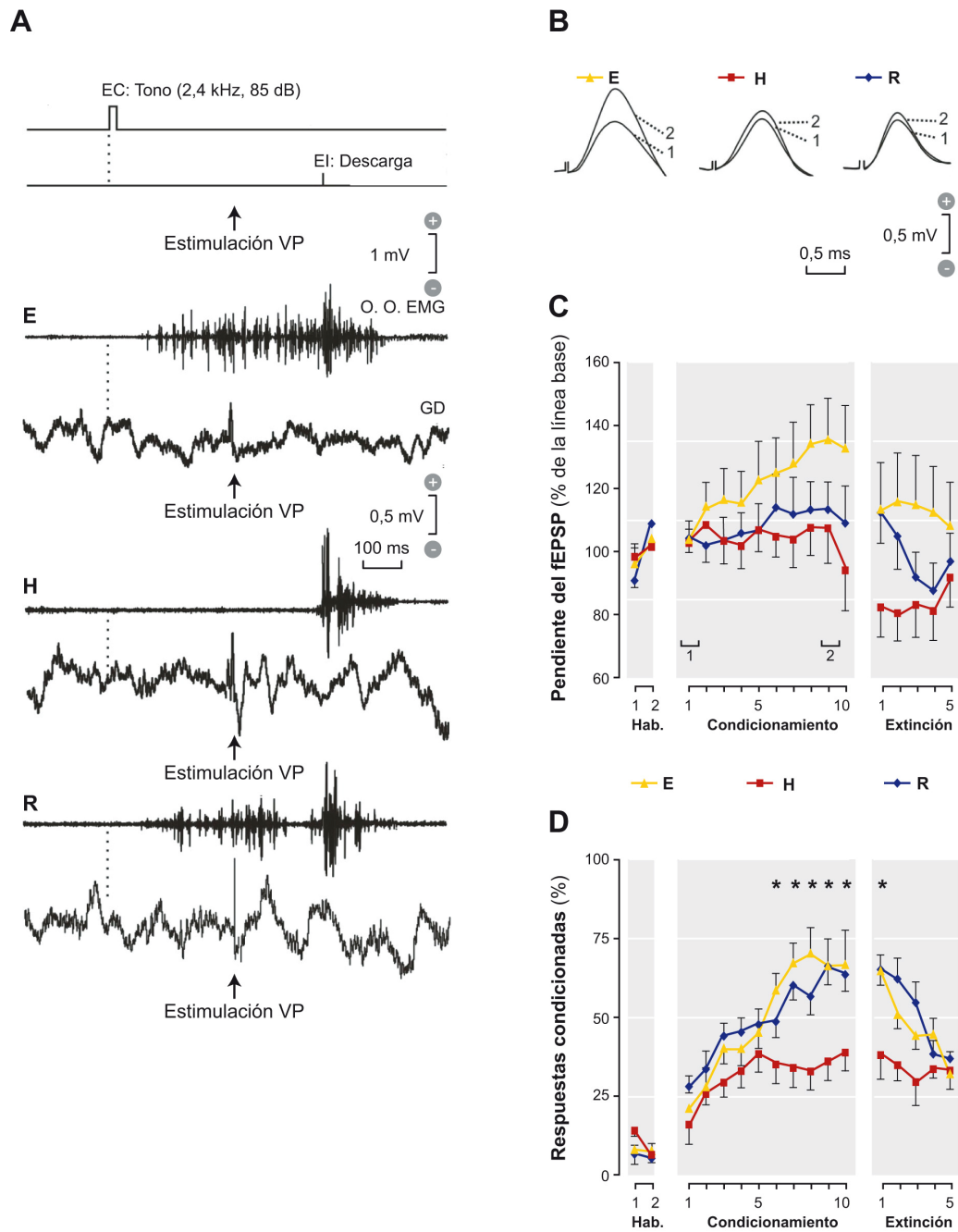


Figura 15. Evolución de los fEPSP provocados en la sinapsis VP-GD durante el condicionamiento clásico del reflejo palpebral. **(A)** En la parte superior se ilustra de forma esquemática la representación del paradigma utilizado en el condicionamiento. Debajo se representan ejemplos de EMG y registros extracelulares recogidos en la octava sesión de condicionamiento de animales E, H y R. **(B)** fEPSP inducidos en la sinapsis VP-GD en animales representativos de cada grupo. Las ilustraciones corresponden al promedio de ≥ 10 registros de la primera (1) y la novena sesión (2) de condicionamiento. **(C)** Evolución de los fEPSP inducidos en el GD por la estimulación en la VP 300 ms después de la presentación del EC en los tres grupos de animales. Los datos representados corresponden a la media \pm error de 20 electrodos por grupo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{32,608} = 1,336$; $P \geq 0,105$). Las sesiones 1 y 9 del condicionamiento representadas en 3B, están indicadas como 1 y 2 bajo los corchetes. **(D)** Se muestran la curvas de aprendizaje en el condicionamiento clásico del reflejo palpebral de los tres grupos de animales para poder correlacionarlas con los cambios en plasticidad sináptica. *, $P \leq 0,001$ entre los animales H y los otros dos grupos (E y R).

Como se había descrito en estudios previos (Weisz *et al.*, 1984), en el grupo E los fEPSP provocados por la estimulación eléctrica de la VP aumentaron progresivamente en pendiente y amplitud (tomando como referencia el 100% de la pendiente media de los fEPSP obtenidos durante las 2 sesiones de habituación) a lo largo de las sesiones de condicionamiento (Figura 15B y C). Es importante destacar que los valores de las pendientes de los fEPSP fueron significativamente mayores ($> 125\%$; $P < 0,001$) a los valores de la pendiente de los fEPSP de la línea base desde la sexta hasta la décima sesión de condicionamiento. Un efecto similar se ha encontrado recientemente en ratas usando el mismo tipo de ejercicio de aprendizaje, lo que apoya fuertemente la implicación de este relevo sináptico en el proceso de adquisición de aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo (Valenzuela-Harrington *et al.*, 2007). Por el contrario, en el grupo H los fEPSP provocados presentaron un pequeño aumento en su pendiente a lo largo de las sesiones de condicionamiento con valores que no fueron estadísticamente significativos comparados con las pendientes de los fEPSP espontáneos de las sesiones de habituación ($< 115\%$; $P \geq 0,457$, Figura 15B y C). Un resultado similar se encontró en el grupo R ($< 107,5\%$ de aumento en la pendiente de los fEPSP con respecto a su línea base; $P \geq 0,658$, Figura 15B y C). Es interesante destacar que la pendiente de los fEPSP aumenta a lo largo de las sesiones de condicionamiento y decrece en las sesiones de extinción en los tres grupos de animales, pero sólo los fEPSP recogidos desde la séptima a la décima sesión en los animales E tuvieron diferencias significativas con respecto a su línea base. Aunque las pendientes de los fEPSP provocados en los animales E a lo largo de las sesiones de condicionamiento alcanzaron valores mayores que los obtenidos para los otros dos grupos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos debidas al estado tiroideo ($F_{32,608} = 1,336$; $P \geq 0,105$), observándose además una alta dispersión de los datos.

Al analizar en profundidad los datos recogidos, se encontraron notables diferencias en la evolución de los fEPSP dependiendo del sitio de registro en el GD, tanto dentro del mismo animal como dentro del mismo grupo. Por ello se analizaron cada uno de los electrodos de cada animal por separado y se observó que algunos electrodos de registro mostraban un aumento de la pendiente de los fEPSP, otros registraban una disminución y otros no mostraban cambios significativos con respecto a la línea base. Por esta razón se decidió llevar a cabo un análisis de regresión lineal de los fEPSP provocados en los electrodos individuales a lo largo de las 10 sesiones de condicionamiento (Figura 16).

En los animales E, el 70% de los electrodos de registro analizados (13/20) presentó un aumento significativo en la pendiente de los fEPSP durante las sesiones de condicionamiento

($P \leq 0,05$), con unos valores para el coeficiente de regresión (r) desde 0,78 a 0,89 y un rango de aumento de las pendientes de 1,9% a 12,4%. El 30% de los electrodos analizados presentaron una disminución significativa en la pendiente de los fEPSP durante el condicionamiento (r : 0,79 a 0,96; $P \leq 0,05$; rango: -1,6% a -5,1%). De los 20 electrodos analizados en el grupo E, 11 (55%) mostraron diferencias de ± 1 la desviación estándar en la pendiente de los fEPSP (Figura 16), bien con un aumento ($n=8$) o una disminución ($n=3$).

Usando el mismo procedimiento, se analizaron los resultados obtenidos en los otros dos grupos. En el grupo H, sólo 5 de los 20 electrodos analizados (25%) registraron un aumento ($n=3$) o disminución ($n=2$) en la pendiente de los fEPSP a lo largo de las sesiones de condicionamiento. La pendiente de los fEPSP registrada en el resto de electrodos ($n=15$; 75%) no presentó cambios significativos (Figura 16). Además, el 70% de los coeficientes r (14/20) presentaron valores $\leq 0,6$ sugiriendo una alta variabilidad en los datos recogidos, un dato no observado en los animales E. En el grupo R se encontraron resultados similares a los del grupo H. Sólo en el 25% de los electrodos analizados (5/20) aumentaron ($n=2$) o disminuyeron ($n=3$) las pendientes de los fEPSP durante las sucesivas sesiones de condicionamiento, excediendo en ± 1 la desviación estándar (Figura 16). El 65% de los coeficientes r (13/20) de los electrodos del grupo R presentó valores $\leq 0,6$ sugiriendo también una alta variabilidad de datos.

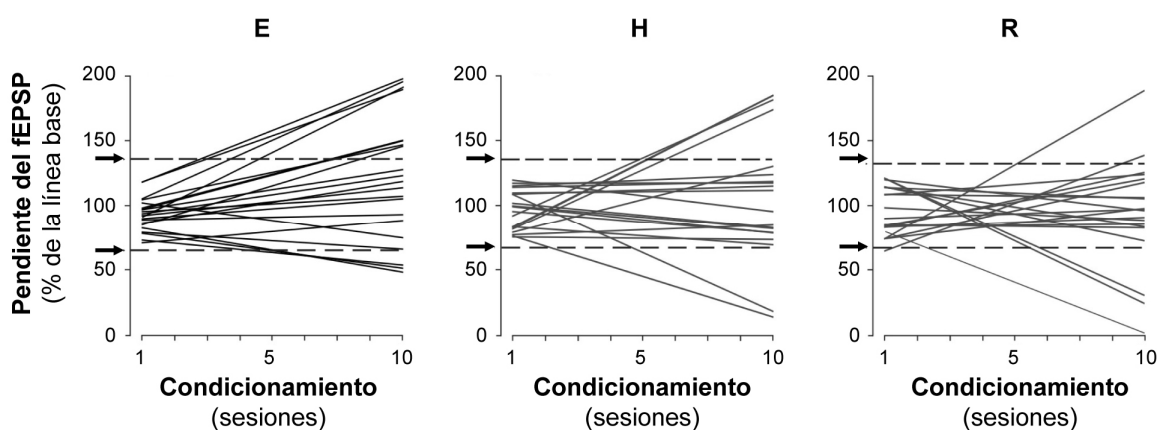


Figura 16. Análisis lineal de la evolución de los fEPSP inducidos en la sinapsis VP-GD a lo largo de las sesiones de condicionamiento en los tres grupos experimentales. Cada línea de regresión corresponde a los datos recogidos de cada uno de los 20 electrodos incluidos en el análisis mostrado en la Figura 15C. Las flechas y líneas discontinuas indican ± 1 la desviación estándar para los datos recogidos para cada grupo. Nótese cómo el número de electrodos que cruza la línea discontinua aumenta durante las sesiones de condicionamiento, así como el número de líneas de regresión que en la sesión 10 de condicionamiento están dentro de las líneas discontinuas.

En resumen, el 55% de las pendientes de los fEPSP registrados en los electrodos de los animales E cambian significativamente durante las sesiones de condicionamiento clásico del reflejo palpebral en la sinapsis VP-GD (Figura 16). Sin embargo, el porcentaje de pendientes de los fEPSP que presentan un cambio significativo a lo largo de las sesiones de condicionamiento en los grupos H y R (Figura 16) fue muy bajo (25%). Estos dos grupos además mostraron una gran variabilidad en los datos, en comparación con la obtenida para los animales del grupo E. De estos resultados se puede concluir que la tiroidectomía altera el reforzamiento sináptico en la sinapsis VP-GD que tiene lugar durante el aprendizaje.

5. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DE LA SINAPSIS VÍA PERFORANTE-GIRO DENTADO

5.1 Análisis del perfil de intensidades

En este experimento, se estudiaron los cambios en la pendiente de los fEPSP provocados en el GD por la estimulación de la VP a intensidades crecientes. Este experimento también se conoce como relación entrada/salida de una sinapsis dada, en este caso de VP-GD. Como se ilustra en la Figura 17 para los animales E, la pendiente de los fEPSP (en mV/s) provocados en el GD aumentó gradualmente al incrementar la intensidad del estímulo hasta que se alcanzaron valores asintóticos, llegando a ser significativamente mayores que los valores de la línea base desde 0,08 hasta 0,3 mA ($P < 0,001$). Sin embargo, la pendiente de los fEPSP provocados en los animales H no aumentó hasta que no se usaron intensidades de estímulo muy superiores a las utilizadas con los animales E (0,18-0,3 mA; $P < 0,001$). Sorprendentemente, los fEPSP provocados en los animales con tratamiento hormonal necesitaron intensidades de estímulo aún mayores para aumentar de forma significativa la pendiente con respecto a su línea base (0,22-0,3 mA; $P < 0,001$). Por otro lado, los fEPSP provocados en los animales E fueron significativamente mayores que los fEPSP provocados en los animales H y R durante un amplio rango de intensidades (0,1-0,3 mA; $F_{28,252} = 76,889$; $P < 0,001$; asteriscos en la Figura 17). Los fEPSP provocados en los animales H presentaron mayores pendientes que las obtenidas en los animales del grupo R para un escaso rango de intensidades (0,24-0,3 mA; $P < 0,001$; signo + en la Figura 17).

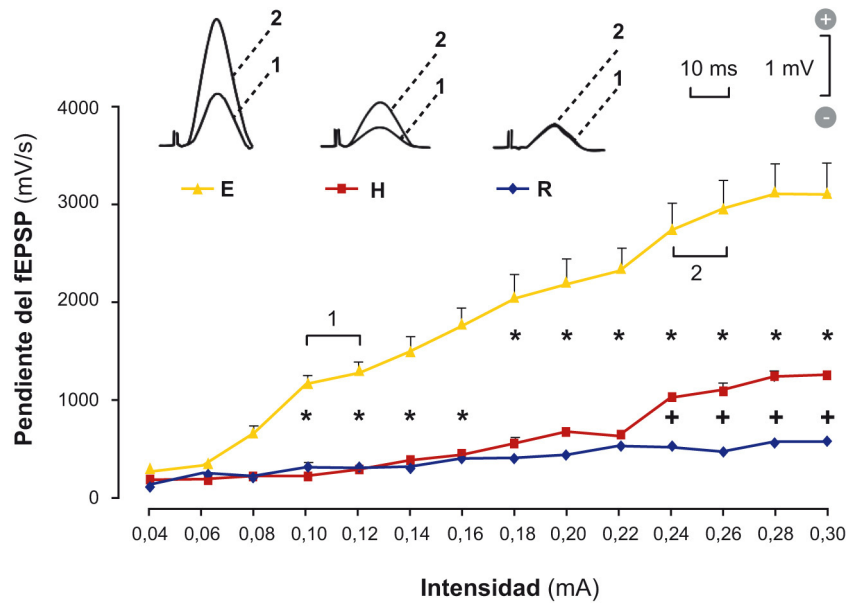


Figura 17. Curva de perfil de intensidades de entrada/salida de la sinapsis VP-GD de los tres grupos de animales. Relación entre la intensidad del estímulo presentado en la VP y la pendiente de los fEPSP provocados en el GD de los animales E, H y R. Los datos ilustrados corresponden a los valores de la media \pm error recogidos de $n=10$ animales/grupo. *, indica diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los E y los otros dos grupos; +, diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los grupos H y R. 1 y 2 indican dos intensidades representativas cuyos fEPSP promediados ($n=3$) se ilustran en la parte superior de la figura.

Estos datos sugieren que la relación entrada/salida en la sinapsis VP-GD está afectada por el déficit de HT y que este efecto no sólo no se compensa por el tratamiento de reemplazo hormonal, sino que los animales R presentan alteraciones más graves que los H.

5.2 Estimulación por pulsos pareados

La estimulación por pulsos pareados es una forma bien conocida de modulación de las sinapsis hipocampales y se usa como medida indirecta de cambios en la probabilidad de liberación del neurotransmisor de la terminal presináptica (Thomson, 2000; Zucker & Regehr, 2002; Lauri *et al.*, 2007). En este experimento se analizó si esta forma de plasticidad sináptica a corto plazo estaba afectada por la deficiencia de HT. Para ello, los animales de los tres grupos fueron estimulados con pares de pulsos a intervalos de tiempo crecientes (desde 10 a 500 ms), a una intensidad fija correspondiente al 40% de la necesaria para provocar una máxima respuesta de los fEPSP. Se midió la variación de la pendiente de los fEPSP en respuesta a ambos pulsos y el grado de facilitación se expresó como la relación porcentual de la pendiente de la segunda

respuesta postsináptica (SRP) con respecto a la primera (PRP). Como se muestra en la Figura 18, los 3 grupos de animales presentaron un aumento significativo ($P < 0,001$) en la respuesta del segundo pulso (SRP) comparada con la provocada por el primer estímulo (PRP) a intervalos cortos de tiempo (10-50 ms). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes de los fEPSP provocados en los 3 grupos de animales ($F_{10,90} = 76,889$; $P \geq 0,988$).

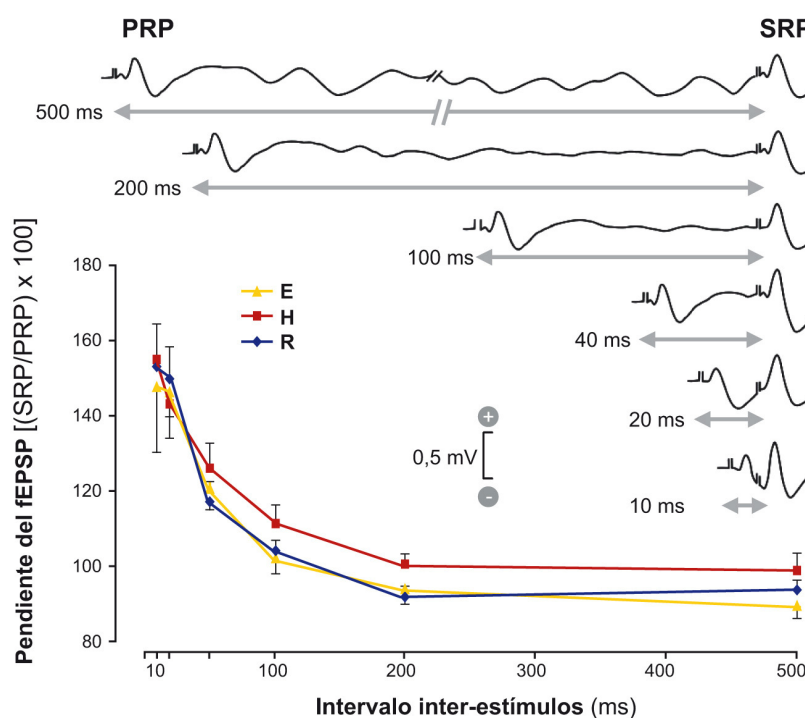


Figura 18. Curva de pulsos pareados en la sinapsis VP-GD. Evolución de la relación de pulsos pareados [(SRP/PRP) x 100] con intervalos de tiempo inter-estímulos crecientes en los tres grupos de animales, E, H y R. Los datos ilustrados corresponden a la media \pm error de los valores recogidos de $n=10$ animales/grupo. En la parte superior de la figura se representan los fEPSP promediados ($n=3$) de los animales E. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Estos datos sugieren que la probabilidad de liberación del neurotransmisor de la terminal presináptica de esta sinapsis no se ve afectada por el estado tiroideo.

5.3 Potenciación a largo plazo (LTP)

Para profundizar en el déficit observado en la plasticidad sináptica en los animales H y R, decidimos llevar a cabo un estudio comparativo de los efectos de una sesión de estimulación de alta frecuencia (HFS) aplicada a la vía perforante en los tres grupos de animales.

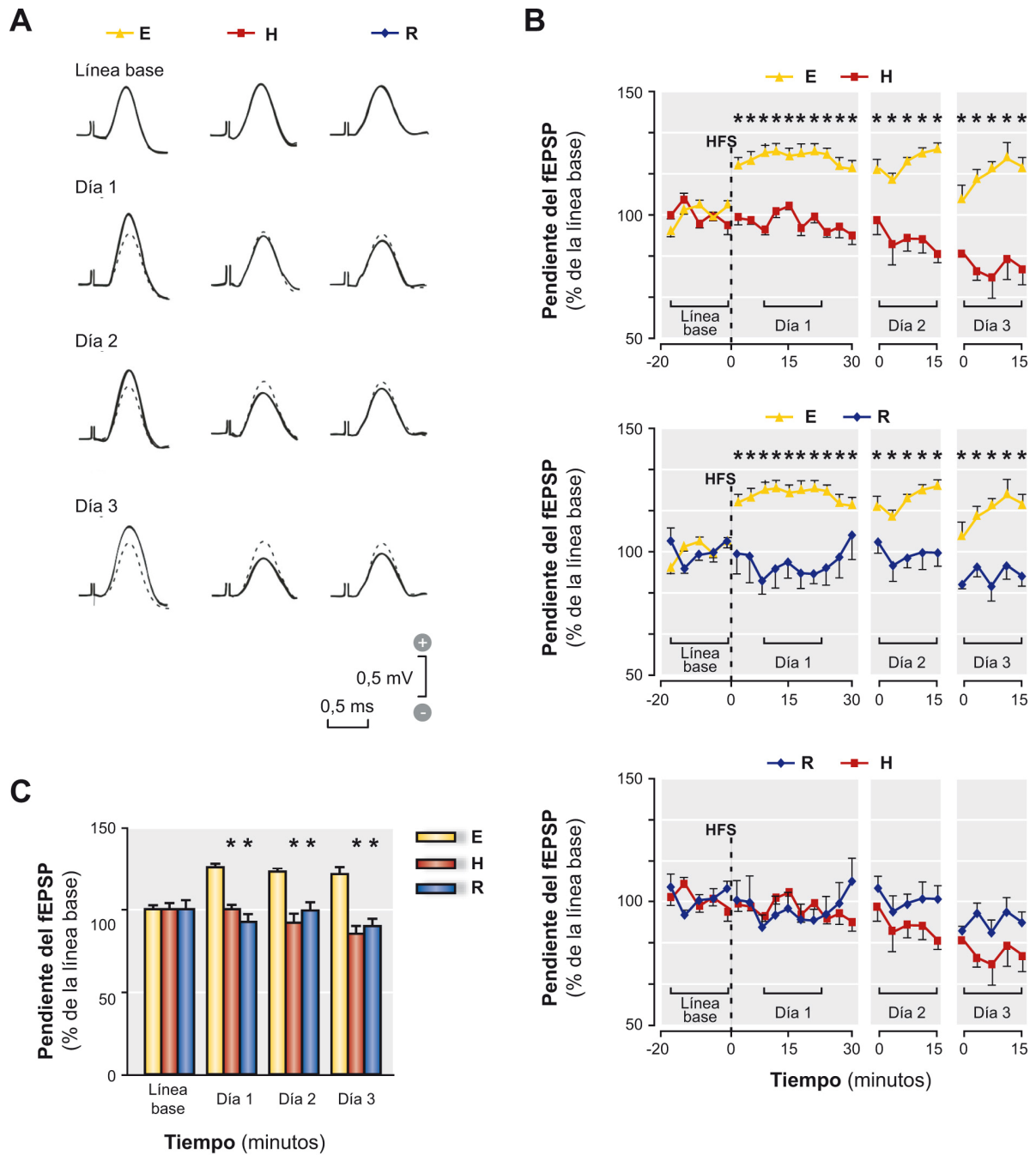


Figura 19. Inducción de LTP en el GD tras la HFS en la VP en los tres grupos de animales. **(A)** fEPSP representativos de animales E, H y R antes (línea base) y 15 min (día 1), un día (día 2) y dos días (día 3) después de la HFS. Cada representación corresponde al promedio de 20 registros. La línea base se muestra en trazos discontinuos. **(B)** Los gráficos muestran los cambios en las pendientes de las fEPSP (media \pm error) antes y después de la HFS con respecto a la línea base (100%). Para mayor claridad se representan los resultados de los tres grupos experimentales ($n = 10$ animales / grupo) por pares (arriba: E frente a H; medio: E frente a R; abajo: R frente a H). **(C)** Análisis cuantitativo de la evolución de la pendiente de los fEPSP (media \pm error). Cada barra corresponde a los datos recogidos durante 15 min en los periodos indicados en B (línea base, 1, 2 y 3). En **B** y **C**, los asteriscos indican diferencias significativas entre los animales E y los grupos H y R ($P < 0,001$).

Con el protocolo utilizado, los animales E mostraron una respuesta de LTP que fue significativamente mayor que la línea base desde 15 min después de la HFS y que duró incluso 2 días después ($P < 0,01$; Figura 19B y C). La respuesta de LTP de los animales E fue significativamente mayor que la obtenida para los animales H y R ($F_{48,432} = 3,549$; $P < 0,001$; asteriscos en la Figura 19B y C). Ni los animales H ni los R fueron capaces de generar LTP en la sinapsis VP-GD. En los animales H el aumento en la pendiente de los fEPSP 15-30 min después de la sesión de HFS apenas fue diferente de la línea base (alrededor de un 103%; $P = 0,420$) y durante los 2 días siguientes los valores de la pendiente de los fEPSP fueron menores que los de la línea base (Figura 19B y C). El grupo R tampoco presentó evidencias de LTP tras la sesión de HFS (Figura 19B y C). Como se puede observar en la Figura 19, la pendiente de los fEPSP del grupo E fue significativamente mayor que la correspondiente registrada en los animales H y R desde el HFS hasta 48 h después ($P < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas en la pendiente de los fEPSP entre los grupos H y R.

Estos resultados indican que, con el protocolo de HFS utilizado, la deficiencia de HT impide la generación de LTP *in vivo* en la sinapsis VP-GD, y que el tratamiento de reemplazo hormonal es incapaz de recuperar esta alteración.

6. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA ACTIVIDAD Y PLASTICIDAD NEURONAL EN LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO

6.1 Subunidad del receptor del neurotransmisor excitatorio glutamato NR1

La proteína NR1 es la subunidad constitutiva del receptor tipo NMDA del neurotransmisor excitatorio glutamato. Este receptor está presente en el terminal postsináptico. El análisis cualitativo de la expresión de NR1 en los tres grupos de animales, mostró su expresión perinuclear en las células granulares del GD y en las piramidales de CA1 y su presencia en la zona proximal de los procesos de estas células en CA1. También se observó marcaje en una subpoblación de células hilares, como ya se había descrito en estudios previos (Nacher *et al.*, 2007). Para analizar su expresión se cuantificó la densidad de señal inmunopositiva para NR1 (NR1+) en la capa granular del GD y en el *stratum pyramidale* de CA1 de los animales de cada condición, E, H y R. El ANOVA de una vía indicó que no había diferencias significativas en la densidad de señal NR1+ entre los grupos en ninguna de las regiones analizadas (GD: $F_{2,20} = 1,916$, $P = 0,174$; CA1: $F_{2,22} = 1,999$, $P = 0,159$; Figura 20).

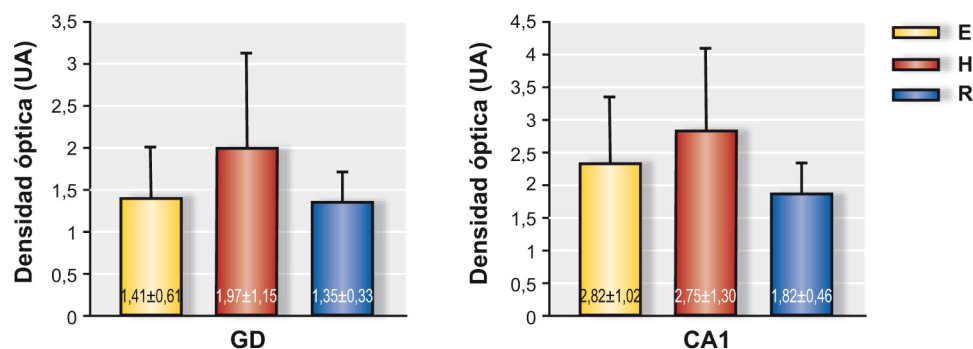


Figura 20. Cuantificación de la densidad de señal óptica NR1+. La gráfica representa la densidad óptica de la señal obtenida para los tres grupos de animales, E, H y R, en la capa granular del GD y en el *stratum pyramidale* de CA1. No se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos ($P \geq 0,103$). UA, unidades arbitrarias.

De estos resultados podemos deducir que la expresión de la subunidad NR1 en el GD y CA1 no está modificada por la deficiencia de HT en el adulto.

6.2 Proteínas específicas de interneuronas GABAérgicas inhibitorias PV y GAT-1

La parvalbúmina (PV) es una proteína citosólica de unión a calcio que se expresa en una subpoblación de interneuronas GABAérgicas que incluye las células en cesto y candelabro encargadas de modular la actividad excitatoria de las células principales (Freund & Buzsaki, 1996). El análisis cualitativo de esta proteína en los tres grupos de animales, mostró su expresión en el soma de estas interneuronas, así como en las terminales perisomáticas, es decir, axones terminales que inervan el cuerpo celular, dendritas proximales y segmentos axonales iniciales de las células granulares del GD y piramidales de CA1 (Guadaño-Ferraz *et al.*, 2003; Venero *et al.*, 2005). Para los análisis cuantitativos, se cuantificó el número de células PV+ en las distintas zonas de la región CA1 (*stratum oriens*, *pyramidale* y *radiatum*) y del GD (lámina superior y lámina inferior) en secciones representativas del hipocampo dorsal de los animales de las diferentes condiciones. También se estudió la densidad de las terminales perisomáticas PV+ en el *stratum pyramidale* de CA1 y en la capa granular del GD.

El análisis cuantitativo del número de células PV+ no mostró diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las regiones estudiadas (GD: $F_{2,8} = 0,338$; $P = 0,723$; CA1: $F_{2,9} = 1,212$; $P = 0,342$; Figura 21). La deficiencia de HT no parece alterar el número de interneuronas

PV+ en el hipocampo de animales adultos. Sin embargo, sí se observaron diferencias entre los grupos en la densidad de terminales PV+ (GD: $F_{2, 42} = 20,508$, $P < 0,001$; CA1: $F_{2, 43} = 12,287$, $P < 0,001$; Figura 22). Los análisis *a posteriori* revelaron un aumento significativo en la densidad de terminales perisomáticas PV+ tanto en CA1 como en el GD en las ratas H al ser comparadas con los animales del grupo E ($P < 0,001$ en ambos casos, Figura 21). Este aumento no fue totalmente compensado por el tratamiento de reemplazo hormonal, ya que el grupo R mostró diferencias significativas al ser comparado con el grupo E tanto en el GD como en CA1 ($P = 0,028$ y $P = 0,036$ respectivamente, Figura 21), así como con el grupo H ($P = 0,002$ y $P = 0,074$ respectivamente). Los resultados indican que la deficiencia de HT provoca un aumento de las terminales PV+ de las interneuronas GABAérgicas en las dos regiones estudiadas, CA1 y GD y que este aumento no se recupera con la administración del tratamiento de reemplazo hormonal.

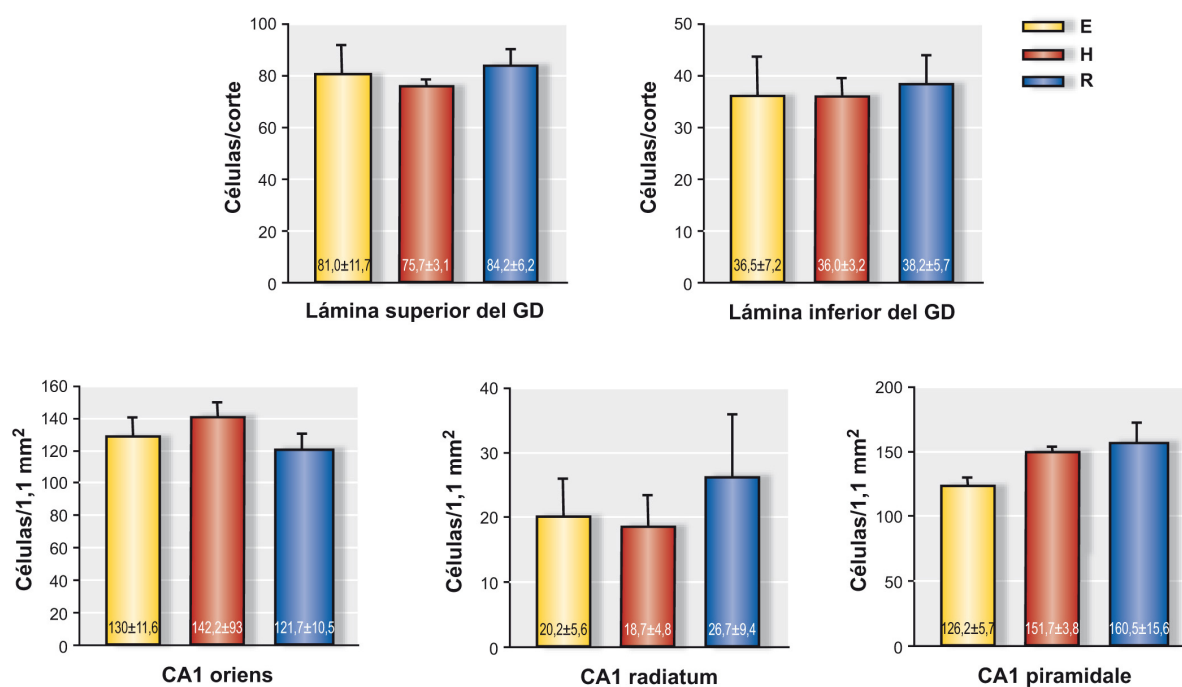


Figura 21. Cuantificación de células inmunoreactivas para la proteína ligadora de calcio PV en el GD y CA1 de los diferentes grupos experimentales, E, H y R. Se cuantificó el número de células PV+ en el GD (lámina inferior y superior de la capa granular) y en CA1 (*stratum oriens*, *piramidale* y *radiatum*). El análisis de las varianzas no mostró diferencias al comparar el número de células PV+ en ninguna de las regiones analizadas ($P \geq 0,178$). Se muestra la media \pm error estándar de la media.

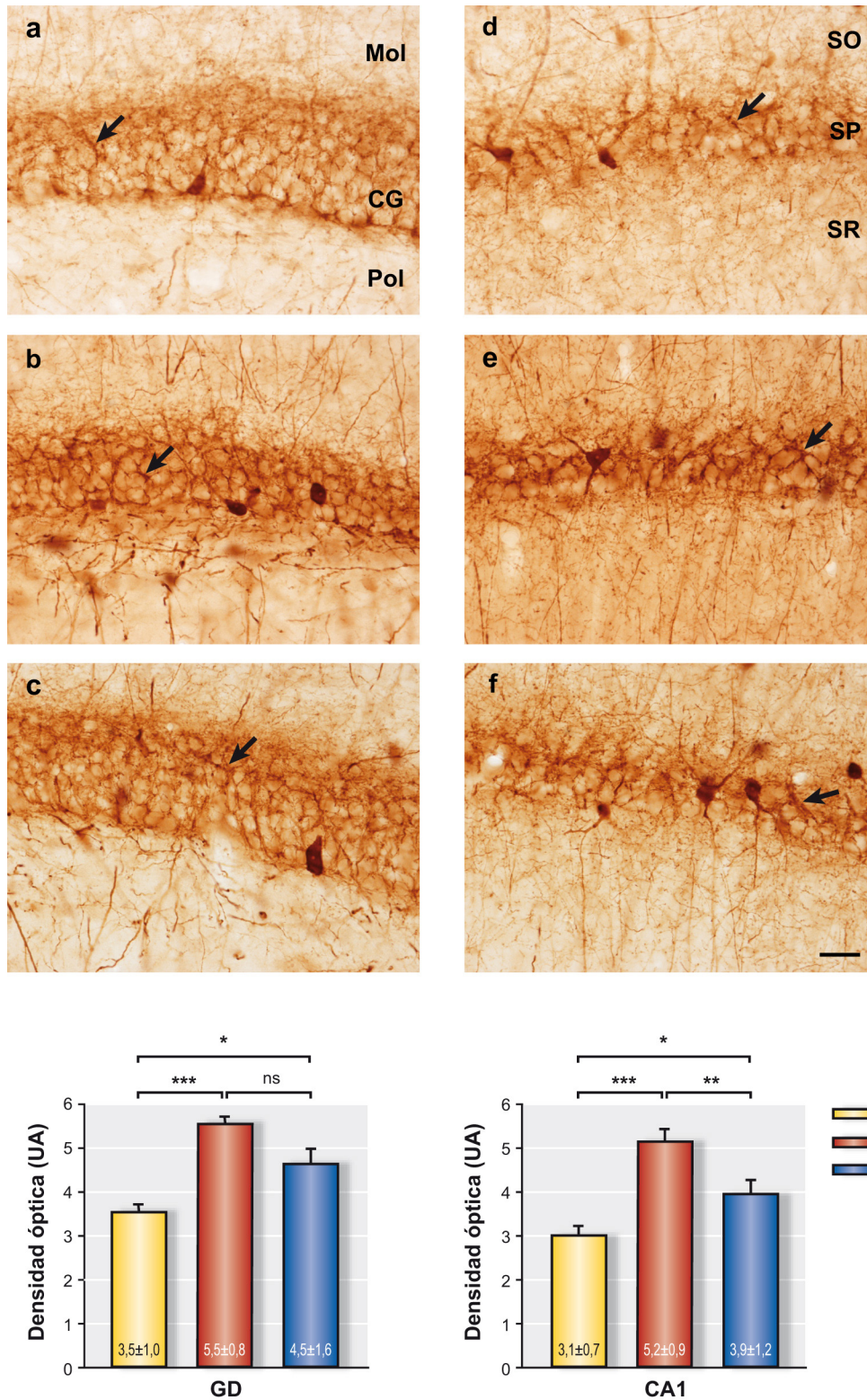


Figura 22. Inmunohistoquímica para la proteína PV en el GD (a, b, c) y CA1 (d, e, f) de animales E (a, d), H (b, e) y R (c, f). Debajo, cuantificación de la densidad de señal óptica PV+ en la capa granular del GD y en el *stratum pyramidale* de CA1 (media \pm SD). ns, no significativo. Diferencias significativas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Mol, capa molecular; CG, capa granular; Pol, capa polimórfica; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*. Las flechas indican terminales PV+ en torno a neuronas granulares y piramidales.

Para profundizar en el análisis de los circuitos inhibitorios de la formación hipocampal, se estudió la expresión del transportador 1 de GABA, GAT-1, que es un buen marcador de terminales GABAérgicas (Guadaño-Ferraz *et al.*, 2003). En la capa granular del GD y en el *stratum pyramidale* de CA1 no se marcan cuerpos celulares GAT-1+, pero sí terminales perisomáticas entorno a los somas de las neuronas granulares y piramidales, de forma similar a los marcados con PV. Se realizó la cuantificación de la densidad de las terminales GAT-1+ en estas regiones. Curiosamente, y al contrario de lo que ocurría con la PV, la densidad de señal para este transportador en la capa granular del GD y en el *stratum pyramidale* de CA1 no mostró diferencias significativas al comparar los 3 grupos experimentales (GD: $F_{2,53} = 0,121$, $P = 0,887$; CA1: $F_{2,47} = 2,807$, $P = 0,071$; Figura 23).

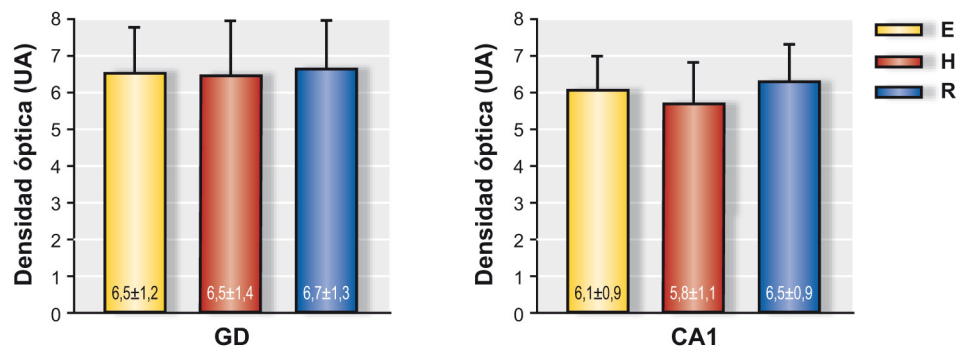


Figura 23. Cuantificación de la densidad óptica de terminales inmunopositivas para el transportador de GABA GAT-1 en los tres grupos experimentales, E, H y R. Se cuantificó la densidad de señal óptica de GAT-1 en la capa granular del GD y en el *stratum pyramidale* de CA1 (se representa media \pm SD). El análisis de las varianzas no mostró diferencias significativas al comparar los tres grupos de animales ($P \geq 0,103$).

En resumen, la deficiencia de HT en el adulto produce un aumento en la densidad de las terminales PV+ tanto en el GD como en la región CA1 del hipocampo comparado con los resultados obtenidos para los animales E, sin modificar ni el número de células PV+ ni la expresión del transportador de GABA GAT-1. El incremento en la expresión de PV en las terminales perisomáticas de los animales hipotiroideos no es compensado por el tratamiento de reemplazo hormonal, sugiriendo que un breve periodo de hipotiroidismo (20 días) provoca alteraciones que no se recuperan tras un tratamiento prolongado durante 8 semanas con HT.

6.3 Proteína de expresión temprana c-Fos

C-Fos es un gen de expresión temprana que codifica para un factor de transcripción importante en procesos de proliferación y diferenciación y que se expresa en el núcleo celular. La expresión de este factor de transcripción se ve incrementada en el GD durante varias horas tras una LTP temprana (Jeffery *et al.*, 1990). Aunque nuestro procedimiento experimental no nos permitió analizar el tejido de los animales a las pocas horas de haberse producido la LTP, se analizó el patrón de expresión basal de esta proteína varios días después de la LTP en los tres grupos de animales.

Se cuantificó el número de células c-Fos+ en la capa granular del GD en animales de las tres condiciones. El análisis no mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{2,9} = 0,439$, $P = 0,658$; Figura 24). Este resultado indica que los 3 grupos de animales parten de un estado de activación basal similar en cuanto al número de célula que expresan c-Fos.

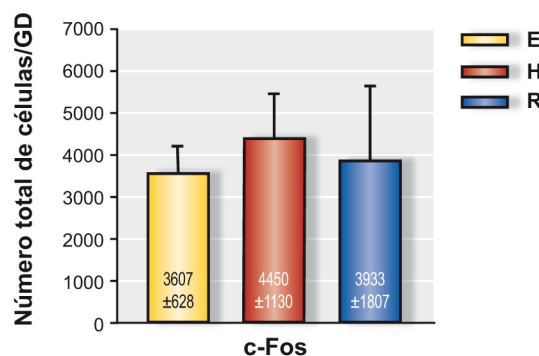


Figura 24. Cuantificación de células inmunopositivas para el factor de transcripción de expresión temprana c-Fos en el GD de los diferentes grupos experimentales, E, H y R. Se representa el número de células c-Fos+ cuantificadas en la capa granular del GD. El análisis no mostró diferencias significativas al comparar los diferentes grupos experimentales ($P = 0,658$). Se muestra la media \pm SD.

6.4 Proteína estructural de densidades postsinápticas PSD-95

PSD-95 o SAP90 es una proteína de andamiaje con múltiples dominios de interacción proteína-proteína, muy abundante en la densidad postsináptica (de ahí sus siglas en inglés, Post Synaptic Density). PSD-95 tiene diversas funciones sinápticas, principalmente por su

interacción con proteínas de la membrana. Puede multimerizar con otras PSD, interaccionar con diferentes receptores de membrana, con proteínas de adhesión celular y con proteínas de señalización sináptica. Se ha demostrado recientemente que PSD-95 puede modular la relación de sinapsis excitadoras/inhedoras en la neurona (Prange *et al.*, 2004). También regula la localización sináptica de proteínas de membrana, suprimiendo su difusión lateral o internalización y estabilizándolas en la sinapsis (Han & Kim, 2008).

El análisis cualitativo de la expresión de PSD-95 mostró una expresión mayoritaria en las capas dendríticas, lo que coincide con su localización postsináptica, por lo que se escogieron la capa molecular del GD y el *stratum radiatum* de CA1 para realizar los análisis posteriores. El análisis cuantitativo de la densidad de señal de PSD-95 mostró diferencias significativas entre los grupos tanto en la capa molecular del GD como en el *stratum radiatum* de CA1 (GD: $F_{2,89} = 14,081$, $P < 0,001$; CA1: $F_{2,89} = 15,509$, $P < 0,001$; Figura 25). Los animales H mostraron una disminución significativa en la densidad de señal de PSD-95 en la capa molecular del GD respecto a los animales E ($P < 0,001$). Esta disminución fue parcialmente recuperada por el tratamiento hormonal, ya que los valores obtenidos para los animales del grupo R presentaron diferencias significativas con respecto a los del grupo H ($P = 0,021$), y cercanas a la significancia respecto al grupo E ($P = 0,082$). También se encontró una disminución en la señal de PSD-95 en el *stratum radiatum* de la región CA1 de los animales H frente a los animales E ($P < 0,001$). El tratamiento hormonal fue capaz de recuperar el efecto producido por el hipotiroidismo en esta región ($P = 0,191$ respecto al grupo E, $P = 0,002$ respecto al H; Figura 25).

De estos resultados podemos concluir que el hipotiroidismo reduce la cantidad de PSD-95 en la capa molecular del GD y en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo. El tratamiento hormonal es capaz de recuperar parcialmente este defecto, siendo más efectivo en la región CA1 que en el GD.

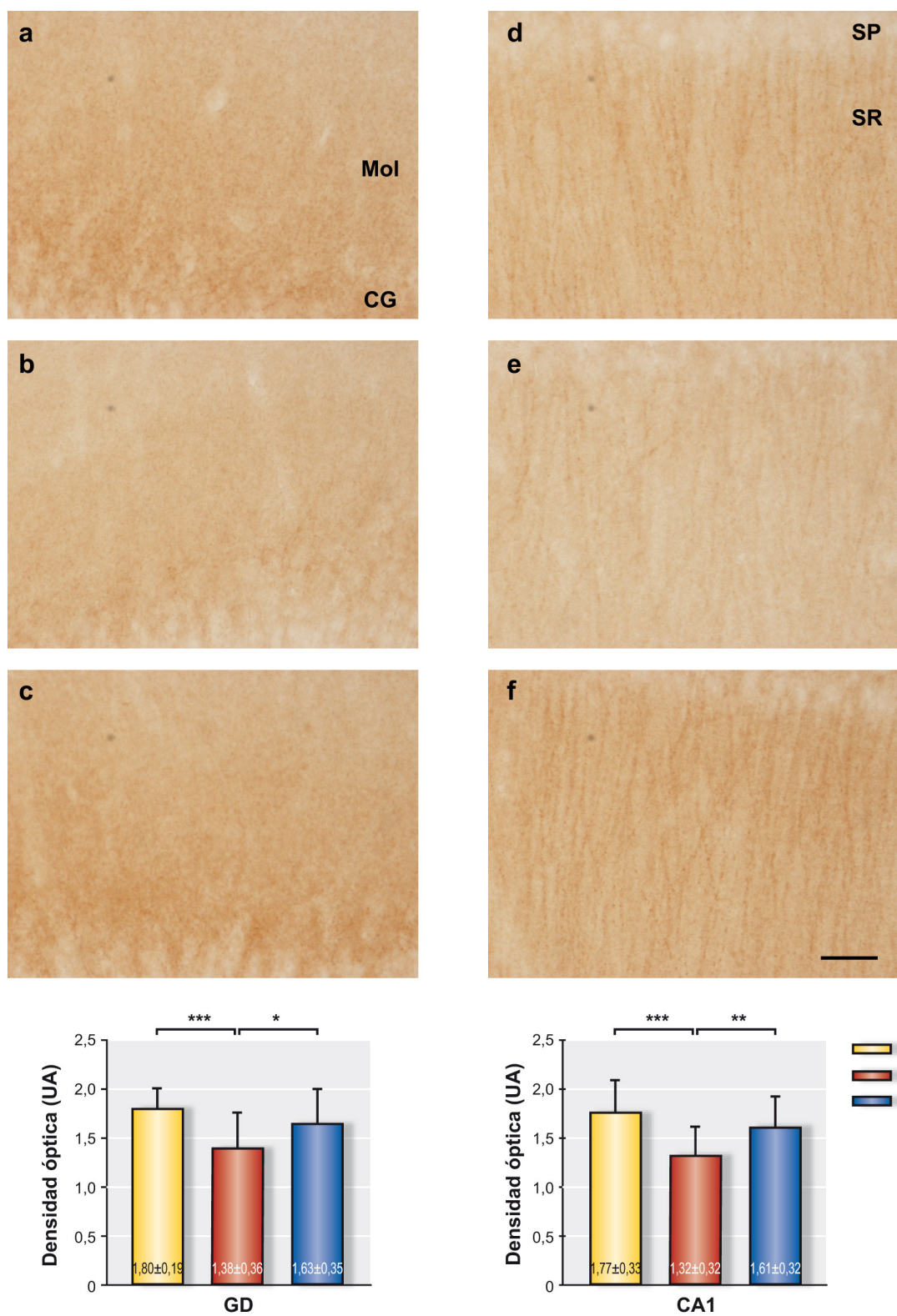


Figura 25. Inmunohistoquímica para la proteína de andamiaje PSD-95 en el GD (a, b, c) y CA1 (d, e, f) de animales E (a, d), H (b, e) y R (c, f). Debajo, cuantificación de la densidad de señal óptica de PSD-95 en la capa molecular del GD y en el *stratum radiatum* de CA1 (media \pm SD). Diferencias significativas: * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$. Mol, capa molecular; CG, capa granular; SP, *stratum piramidale*; SR, *stratum radiatum*.

6.5 Proteína específica de neuroblastos y neuronas inmaduras DCX

Doblecortina (DCX) es una proteína del citoesqueleto que se localiza en el citoplasma, neuritas y conos de crecimiento de neuroblastos y neuronas inmaduras en las zonas neurogénicas adultas (Nacher *et al.*, 2001; Ribak *et al.*, 2004). Trabajos previos del grupo han descrito que la generación de nuevos neuroblastos en el GD, así como su maduración estaban afectadas por el hipotiroidismo adulto (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006). Por ello se analizó por inmunohistoquímica su patrón de expresión. El análisis cualitativo mostró que esta proteína se localiza en los cuerpos celulares y procesos de neuronas generadas *de novo* que se sitúan bordeando la capa granular del GD (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006). Se cuantificó el número de células DCX+ en el GD de los animales de las 3 condiciones experimentales, encontrando diferencias significativas entre los grupos ($F_{2,5} = 30,124$, $P = 0,002$; Figura 26). El hipotiroidismo durante 80 días en el adulto (grupo H) indujo una reducción del 37% en el número de células DCX+ en el GD respecto a las ratas eutiroides ($P = 0,002$; Figura 26). El tratamiento de reemplazo hormonal durante 60 días (grupo R) recuperó esta disminución alcanzando el mismo número de células marcadas que los animales E ($P = 1,000$ respecto a E y $P = 0,006$ respecto a H; Figura 26).

Estos resultados confirman la alteración en la generación y maduración inicial de las neuronas generadas en el GD del adulto debida al hipotiroidismo y su recuperación tras el tratamiento de reemplazo hormonal.

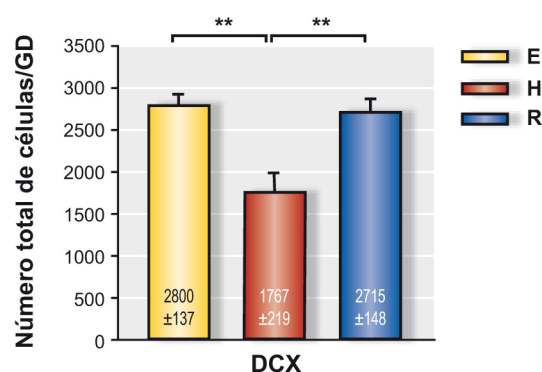


Figura 26. Cuantificación de células inmunoreactivas para la proteína del citoesqueleto de neuroblastos y neuronas inmaduras DCX en el GD de los diferentes grupos experimentales, E, H y R. Se cuantificó el número de células DCX+ en el GD (se muestra la media \pm SD). Diferencias significativas: * * = $P \leq 0,01$.

7. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN EL METABOLISMO DE LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO

Para estudiar las posibles alteraciones metabólicas producidas por el hipotiroidismo en el cerebro adulto, se analizó por HR-MAS el patrón metabólico de la formación hipocampal de ratas de las diferentes condiciones (E=10, H=8, R=8). Como ya se explicó en materiales y métodos, las concentraciones obtenidas con esta metodología fueron relativas al estar normalizadas por los niveles del ácido N-acetil aspártico (NAA). De un total de 29 metabolitos analizados (ver Figura 12, Materiales y Métodos) no se encontraron alteraciones en 25 de ellos. Es importante destacar que no se encontraron diferencias entre los grupos en la concentración local de glucosa, que se considera el principal indicador del metabolismo basal ($F_{2,24} = 1,466$; $P = 0,251$). El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en 4 de los metabolitos analizados (Figura 27): aspártico ($F_{2,24} = 3,878$; $P = 0,035$), glutamina ($F_{2,24} = 4,699$; $P = 0,019$), fosfo-creatina ($F_{2,23} = 4,759$; $P = 0,019$) y taurina ($F_{2,24} = 5,248$; $P = 0,013$). En el caso de los metabolitos aspártico, glutamina y fosfo-creatina no se encontraron diferencias significativas entre los animales E y H ($P = 0,472$; $P = 0,053$; $P = 1,000$, respectivamente; Figura 27). Sin embargo, en estos metabolitos sí se encontraron diferencias significativas entre los animales del grupo E y R, cuantificándose en el grupo R un aumento de las concentraciones de aspártico y glutamina ($P = 0,031$ y $P = 0,039$, respectivamente) y una disminución en las concentraciones de fosfo-creatina ($P = 0,043$). Con respecto a la taurina, se encontró un aumento significativo de este metabolito en el grupo H respecto al E ($P = 0,022$; Figura 27), sin diferencias entre E y R ($P = 1,000$). Tanto en la fosfo-creatina como en la taurina el test de Bonferroni también mostró diferencias significativas entre los animales del grupo H y los del grupo R ($P = 0,029$ y $P = 0,042$, respectivamente).

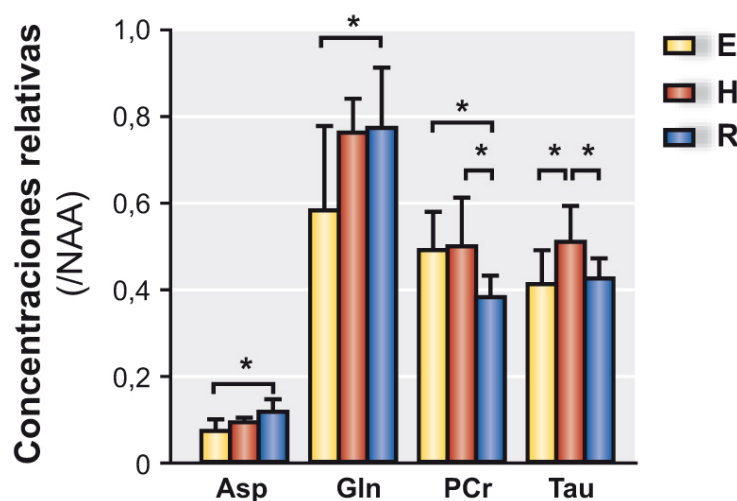


Figura 27. Resultados obtenidos en el análisis del hipocampo dorsal de los tres grupos experimentales (E, n= 10; H, n= 8; R, n= 8) por HR-MAS. Se muestra la cuantificación relativa (normalizada con los niveles de NAA) de los metabolitos que presentaron diferencias al ser analizados por el ANOVA de una vía. Diferencias significativas: * = $P \leq 0,05$. Se muestra la media \pm SD. Asp, aspártico; Gln, glutamina; PCr, fosfo-creatina; Tau, taurina.

Debido a que el análisis del ANOVA de una vía para algunos metabolitos indicó valores de la P al límite de la significación estadística, como es el caso del acetato ($F_{2,24} = 3,352$; $P = 0,052$) y del GABA ($F_{2,23} = 3,215$; $P = 0,059$), se realizó un análisis complementario de anidamiento (nested) de todos los metabolitos estudiados (Figura 28). En este análisis estadístico se exploraron las posibles diferencias debidas a la enfermedad (por el efecto de la tiroidectomía: animales del grupo H y R) y las diferencias debidas al tratamiento hormonal (animales del grupo R). El análisis por anidamiento mostró diferencias en los metabolitos aspártico ($P = 0,020$), glutamina ($P = 0,005$), acetato ($P = 0,046$) y GABA ($P = 0,019$), debidas al efecto de la tiroidectomía (Figura 28). En el caso de la taurina, el análisis por anidamiento indicó que las diferencias entre los grupos en este metabolito se debían al tratamiento, ya que éste recuperó el aumento en las concentraciones de taurina producido por el hipotiroidismo ($P = 0,014$; Figura 28).

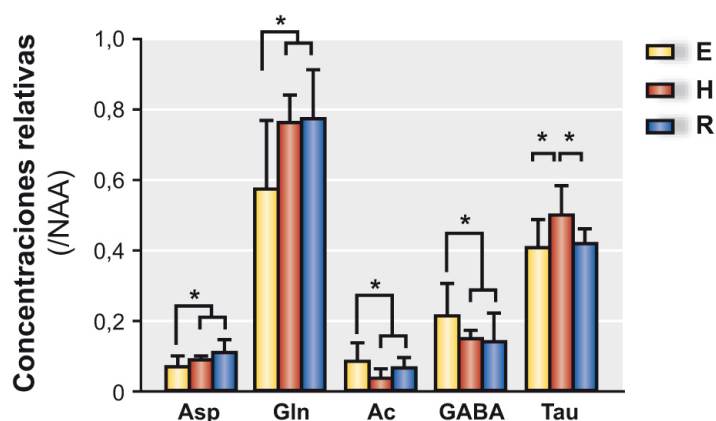


Figura 28. Resultados obtenidos en el análisis del hipocampo dorsal de los tres grupos experimentales (E, $n = 10$; H, $n = 8$; R, $n = 8$) por HR-MAS. Se muestra la cuantificación relativa (normalizada con los niveles de NAA) de los metabolitos que presentaron diferencias al ser analizados por anidamiento (nested). Diferencias significativas: * = $P \leq 0,05$. Se muestra la media \pm SD. Asp, aspártico; Gln, glutamina; Ac, acetato; Tau, taurina.

8. INFLUENCIA DEL ESTADO TIROIDEO EN LOS NIVELES DE SEROTONINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL

Se quiso profundizar en los posibles mecanismos relacionados con los efectos del hipotiroidismo adulto sobre la neurotransmisión serotoninérgica y la relación que existe entre el hipotiroidismo y el aumento del comportamiento de tipo depresivo descrito tanto en pacientes (Joffe & Levitt, 1993) como en animales de experimentación (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006). Para ello, se realizó un estudio preliminar para analizar si el hipotiroidismo en el adulto

modificaba los niveles de serotonina en el hipocampo dorsal así como la modulación de la liberación y recaptación de este neurotransmisor en respuesta a diferentes fármacos en esta región.

En un primer estudio, tras determinar los niveles basales de serotonina en el hipocampo de las ratas, se aplicó de forma local por microdiálisis inversa veratridina, un fármaco que produce despolarización neuronal obteniéndose una liberación masiva de los neurotransmisores. El hipotiroidismo no afectó a la liberación de serotonina en el hipocampo dorsal en comparación con los animales eutiroides ($P= 0,461$; figura 29). Pasadas 2 h se aplicó también por microdiálisis inversa el fármaco citalopram 1 μM , que es un inhibidor de la recaptación de serotonina. En los animales eutiroides este tratamiento no produjo variaciones en los niveles locales de serotonina ($P= 0,146$; figura 29). Sin embargo, los animales hipotiroideos mostraron un aumento significativo de los niveles de serotonina en comparación con los animales eutiroides ($P< 0,001$; Figura 29).

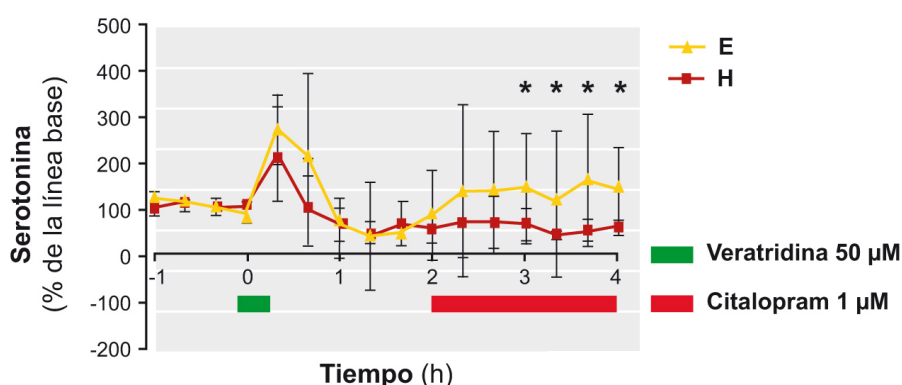


Figura 29. Efecto de la despolarización neuronal por la administración en el líquido de perfusión de veratridina 50 μM sobre los niveles de serotonina en el hipocampo dorsal de ratas hipotiroideas ($n= 6$) y eutiroides ($n= 6$). El aumento de serotonina extracelular fue similar en ambos grupos ($P= 0,461$). Efecto de la inhibición de la recaptación de serotonina por administración en el líquido de perfusión de citalopram 1 μM sobre los niveles de serotonina. El hipotiroidismo aumentó significativamente los niveles de serotonina en comparación con los animales eutiroides ($P< 0,001$). Diferencias significativas: *, $P < 0,001$. Se representa el porcentaje de serotonina con respecto a la línea basal \pm SD.

En un segundo estudio realizado al día siguiente, se analizó la respuesta del sistema a una disminución de los niveles de serotonina provocada por la administración sistémica de diferentes dosis de 8-OH-DPAT, un fármaco agonista del autorreceptor de serotonina. La unión de este fármaco al autorreceptor de serotonina provoca una disminución en la liberación

de serotonina. Los niveles de serotonina en ambos grupos de animales fueron similares con las dos dosis del fármaco analizadas ($P = 0,187$ y $P = 0,212$ respectivamente; Figura 30).

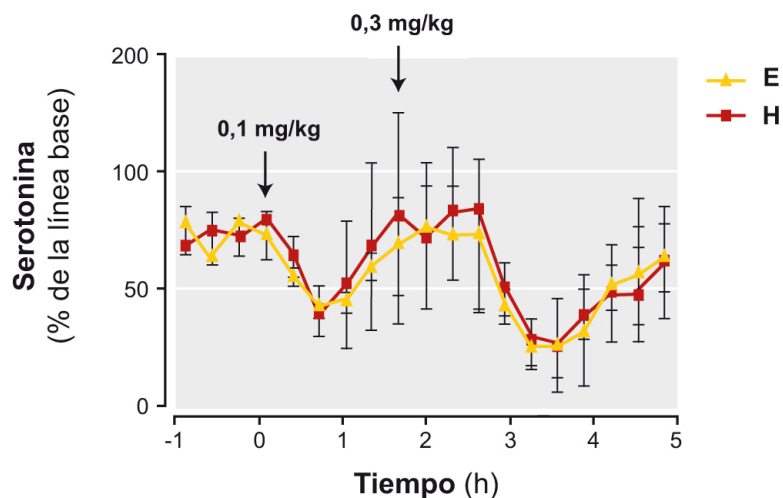


Figura 30. Efecto de la inhibición de la liberación de serotonina en el hipocampo dorsal de ratas de las diferentes condiciones ($n = 6/\text{grupo}$) por la administración sistémica de dos concentraciones diferentes de 8-OH-DPAT (0,1 mg/Kg; 0,3 mg/Kg) un agonista del autorreceptor de serotonina 1A. Los niveles de serotonina en ambos grupos fueron similares con las dos dosis del fármaco analizadas ($P = 0,187$ y $P = 0,212$ respectivamente). Se representa el porcentaje de serotonina con respecto a la línea basal \pm SD.

Estos resultados muestran que la inhibición de la recaptación de serotonina en el hipocampo dorsal de las ratas hipotiroideas es más sensible que en los animales eutiroides y que el hipotiroidismo adulto no interfiere en la modulación de la liberación presináptica de serotonina en el hipocampo dorsal de la rata.

Discusión

1. Adquisición del condicionamiento clásico del reflejo palpebral

El hipotiroidismo adulto en humanos produce diversas anomalías en el SNC incluyendo alteraciones en procesos de aprendizaje y memoria (Leentjens & Kappers, 1995; Capet *et al.*, 2000; del Ser Quijano *et al.*, 2000; Saravanan *et al.*, 2002; Roberts & Ladenson, 2004). Uno de los objetivos de esta tesis ha sido estudiar si el hipotiroidismo iniciado en el adulto modificaba la adquisición del condicionamiento clásico del reflejo palpebral en ratas. Está bien demostrado que este tipo de condicionamiento traza es una forma de aprendizaje asociativo dependiente del hipocampo (Solomon *et al.*, 1986; Moyer *et al.*, 1990; Clark & Squire, 1998). Previo a la realización de este experimento fue necesario evaluar la capacidad auditiva de los animales, ya que el procedimiento experimental de este condicionamiento clásico requiere la asociación de un EC (tono) a un EI (descarga) y es bien conocido que el hipotiroidismo durante el desarrollo, tanto en animales como en humanos, provoca una pérdida funcional de audición (Deol, 1973; Rovet *et al.*, 1996). Sin embargo, en roedores no hay ningún estudio que haya evaluado los efectos del hipotiroidismo adulto en la capacidad auditiva. Nuestros resultados muestran que los potenciales evocados del tronco cerebral de los animales no se modifican por el estado tiroideo, por lo que los animales tiroidectomizados no tienen ningún impedimento para percibir el EC. Estos resultados coinciden con los obtenidos en dos estudios clínicos en los que un corto periodo de hipotiroidismo no afectó a la capacidad auditiva evaluada con la misma técnica (Osterweil *et al.*, 1992; Botella-Carretero *et al.*, 2003). Sin embargo, el único estudio clínico que evalúa la audición de pacientes con periodos de hipotiroidismo variable y sin determinar indica que un 25% de ellos presentaban anomalías en la capacidad auditiva que no mejoraban tras un periodo largo de tratamiento hormonal (6-12 meses; Di Lorenzo *et al.*, 1995), lo que sugiere que un hipotiroidismo prolongado sí podría tener consecuencias persistentes en la capacidad auditiva, al menos en humanos.

Es posible y experimentalmente sencillo inducir el hipotiroidismo adulto con drogas antitiroideas. Nosotros elegimos la tiroidectomía quirúrgica por varios motivos. En primer lugar para evitar posibles efectos adicionales por la administración de drogas sobre el metabolismo cerebral de las HT. Y también, es importante enfatizar que la tiroidectomía en sujetos adultos se utiliza actualmente como herramienta terapéutica en pacientes con cáncer de tiroides. Además, en este trabajo hemos explorado los efectos deletéreos de un breve periodo de hipotiroidismo

adulto, porque es una práctica utilizada en clínica en diferentes protocolos para el seguimiento y tratamiento del cáncer diferenciado de tiroides. La tiroidectomía fue capaz de disminuir las concentraciones de T3 y T4 a niveles mínimos y de detener el crecimiento del animal como se comprueba por la baja ganancia de peso de los animales al igual que había sido descrito anteriormente por otros autores (Obregón *et al.*, 1981). El tratamiento hormonal recuperó tanto los niveles hormonales como la ganancia de peso tras un periodo breve de hipotiroidismo. Todo lo cual valida nuestro modelo experimental.

El presente trabajo demuestra que la adquisición del condicionamiento clásico del reflejo palpebral está severamente dañada por el hipotiroidismo y que el tratamiento de reemplazo hormonal utilizado es capaz de recuperar la capacidad de realizar este aprendizaje. Una cuestión importante en lo que se refiere al aprendizaje asociativo dependiente del hipocampo está relacionada con las neuronas generadas en el GD del adulto. Aunque todavía no están claras sus funciones, se ha demostrado repetidamente que el número de neuronas granulares generadas *de novo* aumenta en paralelo a la adquisición del aprendizaje dependiente del hipocampo, y que la generación de nuevas neuronas granulares es necesaria para algunos tipos de procesos de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo, incluyendo el condicionamiento clásico del reflejo palpebral (Gould *et al.*, 1999; Shors *et al.*, 2001; Kempermann, 2002; Saxe *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado que una reducción experimental mayor del 80% en la tasa de neurogénesis en el GD de ratas adultas (usando el agente antimitótico acetato de metilazoximetanol, que metila el DNA), impide el aprendizaje usando el mismo tipo de condicionamiento utilizado en nuestros estudios (Shors *et al.*, 2001). Nuestros resultados indican que el hipotiroidismo adulto además de impedir este aprendizaje asociativo, provoca una disminución del 30% en la tasa neurogénica en el GD (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006; Fernández-Lamo *et al.*, 2009). En este sentido es importante resaltar que no todas las memorias dependientes del hipocampo se ven alteradas por el bloqueo de la neurogénesis (Shors *et al.*, 2002; Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006; Saxe *et al.*, 2006). Es posible que las neuronas generadas en el adulto puedan contribuir de forma diferente a distintas funciones hipocampales.

Nuestros resultados demuestran además, que en el mismo animal de experimentación, tanto la disminución de la neurogénesis como la deficiencia en el aprendizaje causadas por la tiroidectomía pueden ser revertidas con un tratamiento hormonal capaz de recuperar los niveles plasmáticos de HT. Esto sugiere una estrecha relación entre la neurogénesis en el GD adulto, la adquisición de este aprendizaje asociativo y la modulación por HT de estos dos procesos.

2. Plasticidad sináptica

Se ha demostrado que la adquisición del condicionamiento clásico del reflejo palpebral implica la presencia de cambios plásticos en relevos sinápticos seleccionados, incluyendo la sinapsis CA3-CA1 (Gruart *et al.*, 2006; Whitlock *et al.*, 2006) y la sinapsis VP-GD (Weisz *et al.*, 1984; Valenzuela-Harrington *et al.*, 2007). Debido a la modulación de la neurogénesis en el GD adulto por las HT decidimos centrarnos en el efecto del hipotiroidismo en la sinapsis VP-GD.

Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la transmisión sináptica basal (curvas de entrada-salida) en los animales tiroidectomizados, sin que se observe recuperación con el tratamiento hormonal. Sin embargo, la tiroidectomía no modificó la facilitación por pares de pulsos, que refleja la probabilidad de liberación de los neurotransmisores. Nuestros resultados difieren de un estudio en el que el hipotiroidismo inducido en el adulto por una droga anti tiroidea no modificó la transmisión sináptica basal en la vía hipocampo dorsal-corteza prefrontal medial en ratas anestesiadas, pero redujo significativamente la facilitación por pares de pulsos (Sui *et al.*, 2006). Aunque ambos trabajos utilizaron ratas como modelo experimental, las diferencias observadas podrían deberse al diferente estado del animal a la hora de ser registrado, estado despierto *versus* anestesiado. Además, existen importantes diferencias funcionales entre las dos sinapsis estudiadas. Finalmente, ni las intensidades de los estímulos seleccionados para el estudio de facilitación por pares de pulsos, ni la inducción del hipotiroidismo adulto son comparables en ambos estudios.

La facilitación por pares de pulsos a intervalos interestímulos breves observada en este trabajo para los tres grupos experimentales fue similar a los datos ya publicados en estudios en la neocorteza *in vivo* (Baranyi *et al.*, 1991) e *in vitro* (Markram *et al.*, 1997) y en la región CA1 *in vitro* (Magee & Johnston, 1997) y no se modificó por el hipotiroidismo. Estos resultados son muy interesantes porque indican que el hipotiroidismo no altera este tipo de plasticidad a corto plazo. Además estos resultados, junto con los obtenidos en la medida de liberación de serotonina tanto tras la adición del agonista del autorreceptor 1A como por la despolarización neuronal provocada por la veratridina, sugieren fuertemente que la liberación de neurotransmisores en la terminal presináptica no se ve alterada por el hipotiroidismo, al menos en la formación hipocámpal.

Como indicábamos al comienzo de este apartado, recientemente se ha demostrado tanto en ratones (Gruart *et al.*, 2006) como en ratas (Whitlock *et al.*, 2006, Valenzuela-Harrington, 2007 #30) que se produce un aumento en la fuerza sináptica de las sinapsis CA3-CA1 y VP-GD durante diferentes ejercicios de memoria. De acuerdo con estudios previos en los que se realizaron registros electrofisiológicos en el GD durante el condicionamiento clásico (Weisz *et al.*, 1984, Valenzuela-Harrington, 2007 #30), nuestros resultados indican que en los animales eutiroides despiertos las pendientes de los fEPSP provocados por la estimulación de la VP aumentaron progresivamente a lo largo de las sesiones del condicionamiento traza. Esto indica la implicación de la sinapsis VP-GD en el proceso de aprendizaje.

En contraste con los estudios llevados a cabo en la sinapsis CA3-CA1 en ratones despiertos usando un condicionamiento similar (Gruart *et al.*, 2006), pero de acuerdo con los datos recogidos en ratas despiertas (Whitlock *et al.*, 2006), no todos los sitios registrados en el GD mostraron un aumento significativo en las pendientes de los fEPSP provocados durante el aprendizaje. De hecho, algunos registros mostraron una disminución de los fEPSP durante el condicionamiento, mientras que otros no presentaron cambios significativos. Estos datos junto con los de Whitlock *et al.* (2006) y Valenzuela-Harrington *et al.* (2007) sugieren que, al menos en las ratas, existen regiones hipocampales específicas que están reservadas para ejercicios de memoria concretos.

Nuestros resultados indican que el hipotiroidismo, además de interferir con la adquisición de este aprendizaje asociativo, impide que se generen los cambios sinápticos dependientes de actividad que acompañan al aprendizaje en esta región hipocampal. Sin embargo, aunque la terapia de reemplazo hormonal permitió la adquisición de este ejercicio de condicionamiento traza, los animales tratados no desarrollaron los cambios en la fuerza sináptica registrados durante el condicionamiento en la sinapsis VP-GD como ocurría en los animales eutiroides. Estos datos sugieren que la sinapsis VP-GD queda alterada tras un breve periodo de hipotiroidismo en el adulto y que no se recupera tras un correcto tratamiento hormonal. La adquisición de este ejercicio de condicionamiento traza en ausencia de cambios en la fuerza sináptica en la sinapsis VP-GD, podría explicarse por mecanismos de compensación dependientes de HT, ya que como hemos comentado anteriormente, los animales hipotiroideos ni presentan cambios en la fuerza sináptica ni presentan una correcta adquisición de este ejercicio dependiente de la formación hipocampal.

Los animales eutiroides además de presentar un reforzamiento sináptico durante el condicionamiento, son capaces de desarrollar una LTP en la sinapsis VP-GD con una duración de hasta 2 días después de aplicar la HFS. Sin embargo, nuestros resultados indican claramente que el hipotiroidismo impide la inducción de la LTP en la sinapsis VP-GD. En una serie de estudios pioneros, se ha observado que el hipotiroidismo adulto inducido por tiroidectomía interfiere con la LTP, tanto temprana (medida hasta 70 min después del HFS; Gerges *et al.*, 2001) como tardía (medida hasta 6h después del HFS; Gerges & Alkadhi, 2004; Alzoubi *et al.*, 2009) en la sinapsis CA3-CA1, pero no en la sinapsis VP-GD. Estos experimentos fueron realizados en ratas anestesiadas con uretano y con tiempos de realización de la LTP de hasta 6 h después de la HFS. No puede establecerse una comparación fácil con nuestros experimentos que se llevaron a cabo en animales despiertos y con tiempos de realización de la LTP de hasta 48 h después de la HFS. Además, el hecho de que los animales estén despiertos podría ser un ejercicio que demandara una elevada actividad del GD, ya que los animales se sitúan en un área abierta con cierto nivel de estrés (Gruart *et al.*, 2006; Valenzuela-Harrington *et al.*, 2007). Otro dato a tener en cuenta es el grado de hipotiroidismo de los animales, ya que nuestra tiroidectomía reduce en un 90% los niveles de HT frente al 40% obtenido por estos autores, por lo que se esperaría menores efectos perjudiciales derivados del hipotiroidismo. Por otro lado, el protocolo de HFS utilizado en nuestros experimentos provocó fEPSP que alcanzaron pendientes por debajo de los valores de la línea base en los animales H, como previamente había sido descrito por otros autores (Gerges & Alkadhi, 2004). Estos resultados concuerdan con los mostrados por los mismos autores en un trabajo posterior en el que describen que en las ratas hipotiroideas se produce una facilitación de la expresión de la LTD en la sinapsis CA3-CA1 (Alzoubi *et al.*, 2007). Por otro lado, el hipotiroidismo también impide la LTP en la vía hipocampo dorsal-corteza prefrontal medial medida *in vivo* (Sui *et al.*, 2006), sugiriendo una afectación general de la función de los circuitos corticales debido a bajos niveles de HT circulantes.

De acuerdo con los resultados presentados, la LTP no se recuperó en los animales del grupo R tras un tratamiento prolongado con HT (8 semanas), usando concentraciones de tiroxina similares a las usadas en otros estudios que sí fueron suficientes para recuperar la LTP en la sinapsis CA3-CA1 en ratas adultas tiroidectomizadas (Alzoubi *et al.*, 2005; Alzoubi *et al.*,

2009). Como se indicó anteriormente, el grado de hipotiroidismo en estos animales fue menor que en nuestros estudios.

La falta de recuperación de la plasticidad en los animales R descrita en este trabajo podría explicarse por una dosis y/o duración insuficiente del tratamiento hormonal. Sin embargo, en estos estudios hemos utilizado un tratamiento de reemplazo con una combinación específica de T4 y T3 capaz de restaurar tanto la ganancia de peso corporal de los animales como los niveles hormonales en plasma e hígado, así como en la corteza cerebral (Escobar-Morreale *et al.*, 1996). Además este tratamiento es capaz de recuperar la disminución de la capacidad proliferativa del GD adulto y la generación y maduración de los neuroblastos (células DCX+) observada en ratas hipotiroideas, como se describió en estudios previos del grupo (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006) y como hemos confirmado en esta tesis.

Por otro lado, la no reversión de la plasticidad sináptica dependiente de actividad a pesar de un correcto tratamiento hormonal podría ser debida a un daño neuronal persistente debido a un corto periodo de hipotiroidismo en el adulto. De hecho, distintos casos clínicos refieren alteraciones persistentes tras un tratamiento hormonal capaz de recuperar los niveles plasmáticos de HT (Leentjens & Kappers, 1995; Capet *et al.*, 2000; Roberts & Ladenson, 2004; Tagay *et al.*, 2005). Una posible explicación para los resultados presentados sería la existencia de un daño persistente en la sinapsis VP-GD en los animales del grupo R debido al periodo de hipotiroidismo, lo que impediría los cambios en la fuerza sináptica (curvas de entrada-salida, pendientes del fEPSP durante el condicionamiento) y la generación de una correcta LTP en esta sinapsis. Como ya ha sido propuesto, se requeriría la vía hipocampal completa (incluyendo la sinapsis VP-GD) para desarrollar actividades estresantes, como la LTP o un aprendizaje contextual rápido (McHugh *et al.*, 2007; Nakashiba *et al.*, 2008). Sin embargo, los animales con reemplazo hormonal son capaces de realizar un aprendizaje más sencillo, como la tarea de condicionamiento traza y esto podría explicarse porque la vía monosináptica corteza entorrinal-CA1- corteza entorrinal fuese suficiente para compensar la ausencia de plasticidad observada en la sinapsis VP-GD en estos animales.

Este resultado es sumamente importante, ya que indica que el condicionamiento traza puede ser adquirido en ausencia de una LTP provocada en esta sinapsis, y de hecho sugiere que ambos procesos pueden ser diferenciados experimentalmente. En este sentido recientemente se ha demostrado en ratones despiertos que la LTP provocada en la sinapsis CA3-CA1 y los cambios sinápticos (analizados por la facilitación por pares de pulsos) que ocurren durante este tipo de aprendizaje presentan mecanismos presinápticos opuestos que explican su diferente

evolución a lo largo del tiempo (mientras que tras la HFS se produce LTP que disminuye con el tiempo, la fuerza sináptica aumenta con las sesiones de condicionamiento (Madroñal *et al.*, 2009).

3. Bases moleculares y celulares de la plasticidad

Las bases moleculares y celulares de la LTP, del aprendizaje asociativo y de otras propiedades sinápticas de los circuitos hipocampales han sido estudiadas en detalle y aún son objeto de intenso debate (Bliss & Collingridge, 1993; Citri & Malenka, 2008). Nosotros quisimos profundizar en las causas moleculares que subyacen a las alteraciones en la plasticidad sináptica provocadas por el hipotiroidismo. Para ello hemos estudiado la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la plasticidad y/o función de la sinapsis VP-GD, así como el perfil metabólico en la formación hipocampal dorsal de ratas de las diferentes condiciones experimentales, para determinar si el estado tiroideo puede relacionarse con alteraciones en estos parámetros.

Como una primera aproximación se analizó la estructura de los circuitos inhibitorios por la expresión de la proteína ligadora de calcio parvalbúmina (PV) y el transportador de GABA GAT-1, ya que estos circuitos son sensibles al hipotiroidismo durante el desarrollo (Gilbert *et al.*, 2007) ya la delección y mutación del receptor de HT mayoritario en el cerebro TR α 1 (Guadaño-Ferraz *et al.*, 2003; Venero *et al.*, 2005).

Nuestros resultados indican que el número de células PV+ en CA1 y en el GD no cambia con el estado tiroideo, al igual que ocurre con la expresión de GAT-1. Sin embargo, la tiroidectomía provocó un aumento de las terminales perisomáticas que expresan PV tanto en la región hipocampal CA1 como en el GD, que no se recuperó por la administración de HT. A pesar de ello, la cantidad de GABA en la formación hipocampal dorsal de los animales tiroidectomizados (medida por HR-MAS) es menor en comparación con los animales eutiroides y no se recupera con el tratamiento hormonal. Otros autores han descrito un aumento de GABA tras la tiroidectomía en homogenados de cerebro completo (Chapa *et al.*, 1995), así como en el tálamo e hipotálamo en animales hipotiroideos por inyección i.p. de carbimazol (Upadhyaya & Agrawal, 1993) sin que se observen diferencias en otras regiones como la corteza cerebral. Estos resultados sugieren una regulación distinta de los niveles de GABA por HT en diferentes regiones del cerebro adulto. Puede que el aumento de expresión

de PV que observamos en las terminales perisomáticas de las diferentes regiones hipocampales estudiadas sea un mecanismo compensador de la disminución de GABA para aumentar el número de sinapsis inhibitorias. Aunque la densidad de señal GAT-1+ no se alteró por el hipotiroidismo en la capa granular del GD ni en el *stratum pyramidale* de CA1, esto no indica que el número de terminales perisomáticas de interneuronas inhibitorias sobre las células piramidales y granulares sea el correcto. Se sabe que GAT-1 además de estar presente en las terminales de las neuronas GABAérgicas, también se encuentra en los astrocitos que rodean estas sinapsis. Se ha descrito que en el adulto la expresión de GAT-1 se restringe a sinapsis simétricas (Ribak, 1978). Las alteraciones observadas en la sinapsis VP-GD sugieren un aumento del papel inhibitorio de las interneuronas GABAérgicas en la modulación de los circuitos hipocampales (Toledo-Rodríguez *et al.*, 2005; Jinno & Kosaka, 2006). Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, la deficiencia en la potenciación y en la actividad sináptica de los grupos H y R. Otros autores han propuesto que las alteraciones en la densidad de terminales PV+, analizadas por inmunohistoquímica en diferentes regiones del hipocampo están relacionadas con alteraciones funcionales de los circuitos en los que estas interneuronas están implicadas. Nikonenko *et al.* (2006) usando un ratón deficiente para la molécula de adhesión celular CHL1 mostraron que un aumento en el número total de interneuronas PV+ y en la densidad de las terminales producía una reducción de la LTP en la sinapsis CA3-CA1, sugiriendo que la potenciación de la inhibición era la causa del perjuicio sobre la LTP. Por otra parte, la recuperación de la ansiedad y de los déficits de memoria observados en ratones mutantes dominantes negativos para TR α 1 (dnTR α 1), se ha relacionado con una normalización de las interneuronas inhibitorias GABAérgicas en el área CA1 del hipocampo con un tratamiento con T3 capaz de activar el receptor dnTR α 1 (Venero *et al.*, 2005). Como se muestra aquí, el tratamiento hormonal podría tener contribuciones diferentes y selectivas sobre la recuperación de las funciones y/o los circuitos hipocampales seleccionados. Es importante tener en cuenta que la expresión de las proteínas de unión a calcio en las interneuronas corticales está estrechamente relacionada con sus propiedades fisiológicas (Caillard *et al.*, 2000; Andrioli *et al.*, 2007). Las alteraciones en la expresión de PV en las interneuronas deben afectar a sus propiedades de disparo y alterar la respuesta de la red neuronal en la neurotransmisión excitatoria.

Sin embargo, nuestros resultados no muestran alteraciones debidas al hipotiroidismo en los niveles de expresión de la subunidad constitutiva del receptor de glutamato tipo NMDA, NR1, aunque otros autores han descrito que el hipotiroidismo adulto produce una disminución selectiva de la expresión del mRNA de la subunidad NR1, pero no otras como NR2A y NR2B

en el GD (Lee *et al.*, 2003). Esta discrepancia se puede deber a que no siempre hay una correlación lineal entre la cantidad de mRNA y el nivel de expresión de la proteína (Alzoubi *et al.*, 2007).

En este trabajo también se ha estudiado el gen de expresión temprana que se traduce en el factor de transcripción c-Fos. La expresión de este factor aumenta y se mantiene durante varias horas tras la aplicación de la HFS y se ha descrito que, en el hipotiroidismo congénito por administración de una droga antitiroidea durante el desarrollo, los niveles de expresión de c-Fos disminuyen en la región CA1 del hipocampo 30 min después de la HFS (Dong *et al.*, 2005). En esta tesis se ha estudiado por inmunohistoquímica el número de células que expresan c-Fos de forma basal en el GD y no se encontraron diferencias debidas al estado tiroideo de los animales. No se pueden comparar fácilmente ambos resultados, ya que difieren tanto en la región analizada como en el periodo de hipotiroidismo y el intervalo de tiempo estudiado tras la aplicación de la HFS.

Como se ha descrito en los resultados, el análisis de la proteína de andamiaje PSD-95 en el GD indica que el hipotiroidismo reduce fuertemente su expresión, que se recupera parcialmente tras el periodo de tratamiento hormonal. Esta disminución de la expresión de PSD-95 en la capa molecular del GD, junto con el aumento de la expresión de PV en las terminales perisomáticas de la capa granular en animales tiroidectomizados, podría explicar la falta de plasticidad sináptica en esta región. Se ha demostrado recientemente que los niveles de expresión de PSD-95 pueden modular la relación de sinapsis excitatorias/inhibitorias en la neurona. PSD-95 recluta moléculas de adhesión celular como neuroligina 1 en la sinapsis excitatoria y transloca neuroligina 2 desde la sinapsis inhibitoria a la excitatoria, aumentando la relación excitación/inhibición en las neuronas del hipocampo. Una disminución del 56% de las agrupaciones de PSD-95 en la densidad postsináptica por el uso de un RNA pequeño de interferencia aumentó el número de sinapsis inhibitorias y disminuyó el número de sinapsis excitatorias (Prange *et al.*, 2004). La disminución de PSD-95 junto con el aumento de PV apoya la idea anteriormente planteada de un aumento en el número de sinapsis inhibitorias en el GD y en CA1. Además, al no variar la expresión de GAT-1 habría una menor recaptación de GABA en un número mayor de sinapsis inhibitorias lo que potenciaría su acción en la sinapsis. Esto también podría actuar como mecanismo compensatorio de la disminución de los niveles de GABA para evitar excitotoxicidad.

Un trabajo posterior (Toro & Deakin, 2005) realizado en muestras de tejido de pacientes esquizofrénicos y/o con desordenes bipolares relacionados con depresión mayor muestra, al

igual que nuestros resultados en ratas tiroidectomizadas, una reducción de PSD-95 en la capa molecular del GD sin que se observen diferencias en los niveles de NR1. Todos estos resultados sugieren fuertemente que un desacoplamiento entre los receptores NMDA y PSD-95 puede producir alteraciones en la plasticidad sináptica y por tanto en el aprendizaje y la memoria, además de contribuir al mantenimiento de estados depresivos.

Nuestros resultados muestran que tras el tratamiento hormonal existe una recuperación mayor de los niveles de PSD-95 en la región CA1 que en el GD. Además los resultados de la expresión de PV en estas dos regiones muestran que, mientras en el GD no existen diferencias significativas entre los animales H y R, en la región CA1 si existen, con una disminución significativa de la expresión de PV en los animales R (nótese que en las dos regiones existen diferencias de expresión entre los grupos E y R, por lo que no podemos hablar de una recuperación completa, si no de una mayor tendencia a la recuperación en la región CA1 que en el GD). Estos datos apoyan la idea de que en la región CA1 se produce una tendencia a la recuperación de las alteraciones producidas por el hipotiroidismo tras el tratamiento hormonal. Así pues estos resultados refuerzan la idea anteriormente expuesta de que la monosinapsis corteza entorrinal- CA1- corteza entorrinal pueda compensar por sí sola la ausencia de plasticidad encontrada en la sinapsis VP-GD en los animales del grupo R, permitiendo la adquisición del condicionamiento traza en estos animales.

4. Metabolismo en la formación hipocampal dorsal

Las neuronas, debido a la transmisión sináptica, liberan una serie de neurotransmisores al medio extracelular (glutamato, GABA, etc.). Este hecho trae consigo una disminución intracelular de la concentración de metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, de sus siglas en inglés TriCarboxylic Acid), principalmente oxalacetato y α -cetoglutarato, que actúan fundamentalmente como precursores de neurotransmisores. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que los astrocitos están implicados en el mantenimiento de los niveles de los metabolitos intermediarios del ciclo TCA de las neuronas a través de la compartimentación intercelular del glutamato y la glutamina (Tsacopoulos & Magistretti, 1996). Las neuronas están metabólicamente impedidas, en el sentido de que no son capaces de sintetizar *de novo* los neurotransmisores glutamato y GABA a partir de glucosa. El ciclo metabólico glutamato/GABA-glutamina es el responsable de la cooperación metabólica astrocito-neurona. Las neuronas liberan glutamato o GABA a la terminal sináptica y el exceso

de estos neurotransmisores es recapturado por la neurona presináptica y también por los astrocitos que rodean la sinapsis. El GABA capturado por los astrocitos es transformado tras varias reacciones en glutamato. Gracias a la enzima glutamina sintetasa (GS), el glutamato es transformado en glutamina, que pasa a las neuronas, donde se metabolizará a glutamato (neuronas glutamatérgicas) o GABA (neuronas GABAérgicas). El glutamato también es recogido por los astrocitos y transformado directamente en glutamina.

A diferencia de los resultados obtenidos en homogenados completos de cerebros (Chapa *et al.*, 1995), en los que se observó un aumento de GABA en ratas hipotiroideas, nuestros resultados, obtenidos por estudios de HR-MAS en animales hipotiroideos, muestran una disminución de GABA y un aumento de glutamina, sin que se modifiquen los niveles de glutamato, en la formación hipocampal dorsal de las ratas. Estos resultados podrían indicar una diferente regionalización de los niveles de GABA, de manera que aumenten por el hipotiroidismo adulto en el cerebro en general, pero disminuyan en concreto en el hipocampo. Otros autores han señalado que mientras que en unas regiones cerebrales, como el hipotálamo o el tálamo las concentraciones de GABA disminuyen por el hipotiroidismo adulto, otras regiones como la corteza no presentan alteraciones (Upadhyaya & Agrawal, 1993). Esto muestra que no todas las regiones cerebrales presentan la misma sensibilidad por HT. También se ha observado que en diferentes regiones de la corteza (frontal, prefrontal y visual) el hipotiroidismo produce una disminución tanto de la expresión como de la actividad de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), encargada de la producción de GABA a partir de glutamato en las neuronas GABAérgicas (Kalaria & Prince, 1986; Virgili *et al.*, 1991). Una disminución de la actividad de la enzima GAD en la formación hipocampal también podría explicar la disminución de los niveles de GABA observados en los estudios de HR-MAS en los animales tiroidectomizados. Otros autores han descrito un aumento de recaptación de GABA en homogenados de cerebro por deficiencia de HT (Mason *et al.*, 1987).

El aumento en los niveles de glutamina que detectamos en los animales hipotiroideos, podría explicarse por un aumento de los niveles de glutamina sintetasa (GS) como indica un estudio previo también realizado en homogenados de hipocampo de ratas hipotiroideas (Virgili *et al.*, 1991).

El tratamiento de reemplazo hormonal fue incapaz de revertir las alteraciones en GABA y glutamina en nuestro modelo experimental. Con respecto a esto, también se ha demostrado tanto en cultivos de astrocitos (Aizenman & de Vellis, 1987) como en cocultivos astrocitos-neuronas (Courtin *et al.*, 1988) que niveles elevados de HT aumentan los niveles de GS. A

juzgar por nuestros estudios, así como por los anteriormente descritos, parece que la regulación de la GS es muy sensible a las concentraciones de HT y que pequeñas variaciones en sus niveles pueden alterar (generalmente aumentando) los niveles de GS, produciéndose un aumento de glutamina, un precursor del glutamato y de GABA en el SNC.

Tanto el acetato como el aspartato son compuestos que juegan un papel importante en el ciclo TCA, y en nuestros estudios se ven alterados de diferente forma por el hipotiroidismo, ya que mientras que el acetato disminuye, el aspartato aumenta sin que haya diferencias en los niveles de glucosa. El reemplazo hormonal fue incapaz de recuperar los niveles de estos metabolitos a los encontrados en los animales eutiroides. El acetato sólo es metabolizado en el ciclo TCA de los astrocitos, no de neuronas, y en ratas tiroidectomizadas se ha demostrado una disminución de la contribución del acetato exógeno (infundido vía yugular) en el ciclo TCA glial (Chapa *et al.*, 1995). Con respecto al aspartato, se ha demostrado que el hipotiroidismo reduce los niveles del transportador de glutamato/aspartato (GLAST) presente en la membrana de las mitocondrias. Este transportador se expresa mayoritariamente en los astrocitos y este efecto del hipotiroidismo sobre la disminución de GLAST podría aumentar la acumulación de aspartato en los astrocitos (Zamoner *et al.*, 2008). Nuestros resultados demuestran que el hipotiroidismo interfiere en la cooperación metabólica entre astrocitos y neuronas en la formación hipocampal de la rata. El tratamiento hormonal no recupera todas las alteraciones producidas en los niveles de metabolitos implicados en esta colaboración astrocito-neurona.

La taurina es un aminoácido no proteico muy abundante en diferentes tejidos incluido el cerebro. Este aminoácido está implicado tanto en la regulación del volumen celular por control de la osmolaridad, como en diferentes funciones neuromoduladoras y neuroprotectoras (Albrecht & Schousboe, 2005). Se ha demostrado que la taurina (añadida exógenamente en rodajas hipocampales en cultivo) activa los receptores GABA_A en CA1 (del Olmo *et al.*, 2000). Nuestros resultados muestran que el hipotiroidismo aumenta los niveles de taurina en el hipocampo y que el tratamiento hormonal reduce este incremento a los niveles de las ratas eutiroides. Este efecto ayudaría a explicar un aumento de la funcionalidad inhibitoria al aumentar la actividad de los receptores de GABA en el hipocampo de las ratas hipotiroideas, pero no en el grupo de reemplazo hormonal.

5. Alteraciones en los niveles de serotonina por el hipotiroidismo adulto

Como hemos descrito en nuestros resultados, el hipotiroidismo no altera la liberación de serotonina en la formación hipocampal dorsal de ratas adultas como se comprueba por la administración de veratridina y 8-OH-DPAT. Este resultado confirma datos previos de otro grupo (Kulikov *et al.*, 1999) que demuestran que el estado tiroideo no afecta a la densidad de los receptores 1A de serotonina (medidos por la unión de ^3H -8-OH-DPAT a este receptor, que se encuentra mayoritariamente en los cuerpos celulares y en las dendritas de las neuronas serotoninérgicas). Esto indica que la liberación de serotonina parece ser independiente de los niveles de HT y concuerda con la no afectación de la facilitación por pares de pulsos en los animales hipotiroideos.

Sin embargo, el hipotiroidismo adulto provocó un aumento significativo de serotonina con respecto a los animales eutiroides tras la inhibición de su recaptación por el antidepresivo citalopram. Aunque con nuestros experimentos no podemos explicar los mecanismos responsables de esta alteración, este aumento de serotonina en la hendidura sináptica por efecto del antidepresivo no debe relacionarse con un aumento de su función. Se ha descrito que el hipotiroidismo reduce tanto el número como la sensibilidad del receptor 2A de serotonina en corteza de ratas tiroidectomizadas (Kulikov *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2002). Por tanto, puede que el efecto de la serotonina en el cerebro hipotiroideo sea menos efectivo (por disminución del número y de la sensibilidad del receptor 2A) explicando, al menos en parte, el aumento del estado de tipo depresivo en los animales hipotiroideos y su recuperación a niveles de los animales eutiroides por administración de HT (Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006).

6. Conclusiones finales

Nuestros estudios experimentales apoyan fuertemente la hipótesis de que el hipotiroidismo inducido en el adulto en humanos pueda generar trastornos persistentes en la estructura y función de la formación hipocampal. La mayoría de los pacientes hipotiroideos muestran una excelente prognosis y una recuperación casi completa de todos los síntomas después del tratamiento de reemplazo hormonal. Sin embargo, muchos pacientes se suelen quejar de su sensación de bienestar, y existen algunos estudios y casos clínicos que muestran que la función

neurocognitiva puede no restaurarse por completo a pesar de un adecuado tratamiento con HT (Leentjens & Kappers, 1995; Capet *et al.*, 2000; Roberts & Ladenson, 2004; Tagay *et al.*, 2005).

En esta tesis hemos profundizado en la fisiopatología del hipotiroidismo adulto sobre la formación hipocampal, estudiando sus efectos y la respuesta al tratamiento hormonal en ratas con diferente estado tiroideo. Para ello hemos evaluado la capacidad de aprendizaje y memoria (con un ejercicio de condicionamiento clásico del reflejo palpebral) y los mecanismos tanto moleculares (con estudios inmunohistoquímicos y de microdiálisis intracerebral *in vivo*) como electrofisiológicos (con estudios de cambios en la fuerza sináptica durante el aprendizaje o dependientes de actividad y LTP) que subyacen a la plasticidad sináptica en la formación hipocampal, así como el metabolismo de esta región (con estudios de HR-MAS). Los resultados obtenidos indican que las HT juegan un papel muy importante en los mecanismos de plasticidad sináptica dependientes de actividad en la formación hipocampal del cerebro adulto. Nuestros resultados también muestran claramente que son muchas las alteraciones producidas por la deficiencia de HT en esta región y que no todas las alteraciones provocadas por un breve periodo de hipotiroidismo son reversibles tras el tratamiento con HT.

En los escasos estudios clínicos que muestran alteraciones metabólicas en el cerebro adulto debidas al hipotiroidismo se constata que el tratamiento hormonal es capaz de revertir estas alteraciones (Constant *et al.*, 2001). Por ello es interesante destacar las alteraciones persistentes debidas al hipotiroidismo observadas en esta tesis en algunos metabolitos hipocampales analizados por HR-MAS que probablemente han sido detectadas por la mayor resolución y sensibilidad esta técnica.

Por todo esto, consideramos que nuestros estudios apoyan claramente la necesidad de mejoras en el diagnóstico de esta enfermedad y una extensa revisión de los protocolos clínicos que inducen hipotiroidismo en el adulto, incluso por breves periodos de tiempo, para poder prevenir en la medida de lo posible alteraciones persistentes en el funcionamiento del cerebro adulto.

Conclusiones

- 1- El hipotiroidismo inducido por tiroidectomía quirúrgica en el adulto no interfiere en la capacidad auditiva de los animales (ni en el umbral de audición ni en la velocidad de conducción de la respuesta).
- 2- El hipotiroidismo en el adulto impide la adquisición de un aprendizaje clásico asociativo dependiente del hipocampo. El tratamiento de reemplazo hormonal revierte los efectos del hipotiroidismo y es capaz de permitir la correcta adquisición de esta tarea de aprendizaje.
- 3- El hipotiroidismo en el adulto impide la respuesta de potenciación de la fuerza sináptica durante el proceso de aprendizaje en la sinapsis VP-GD. Un tratamiento de reemplazo hormonal prolongado no es capaz de revertir esta alteración.
- 4- El hipotiroidismo iniciado en el periodo adulto no altera la probabilidad de liberación de los neurotransmisores, medida por la estimulación por pulsos pareados en la sinapsis VP-GD. Sin embargo, el hipotiroidismo sí altera otras propiedades funcionales de esta sinapsis, que además no se recuperan con el tratamiento de reemplazo hormonal utilizado. Esto ocurre con la anómala respuesta frente a estímulos de intensidades crecientes y con la falta de potenciación a largo plazo tras la estimulación de alta frecuencia en la VP que se observa en los animales tiroidectomizados.
- 5- El hipotiroidismo en el adulto no altera la expresión hipocampal de la subunidad constitutiva del receptor tipo NMDA del neurotransmisor excitatorio glutamato NR1.
- 6- La deficiencia de HT en el adulto produce un aumento en la densidad de las terminales perisomáticas de interneuronas GABAérgicas PV+ tanto en el GD como en CA1, sin modificar ni el número de células PV+ ni la expresión del transportador de GABA GAT-1. El tratamiento de reemplazo hormonal no recupera el incremento en la expresión de PV en los terminales sinápticos de los animales hipotiroideos. Este resultado podría relacionarse con un aumento de la contribución inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas en estas regiones. Las alteraciones en la expresión de PV pueden afectar también a las propiedades de disparo de estas interneuronas y alterar la respuesta de la red neuronal en la neurotransmisión excitatoria.

- 7- El hipotiroidismo disminuye la expresión de la proteína estructural de densidades postsinápticas PSD-95 tanto en el GD como en CA1. El tratamiento hormonal recupera parcialmente esta disminución, siendo más efectivo en la región CA1 que en el GD. El aumento de la expresión de PV en los terminales de la capa granular del GD junto con la disminución de los niveles de expresión de la proteína de andamiaje PSD-95 en la capa molecular en los animales tiroidectomizados podría explicar la falta de plasticidad sináptica en esta región, ya que se ha demostrado recientemente que PSD-95 puede modular la relación de sinapsis excitadoras/inhedoras en la neurona.
- 8- El hipotiroidismo en el adulto altera las concentraciones de metabolitos cerebrales relacionados con el metabolismo energético y con la neurotransmisión. Algunos de estos metabolitos no se recuperan incluso después de 2 meses de un tratamiento de reemplazo hormonal.
- 9- El hipotiroidismo adulto no modifica la liberación de serotonina en el hipocampo dorsal, pero la sensibilidad a la inhibición de la recaptación en esta región es más sensible en los animales hipotiroideos.
- 10- Nuestros resultados muestran que no todas las alteraciones producidas por un periodo de hipotiroidismo breve iniciado en el adulto se revierten con un tratamiento de reemplazo hormonal prolongado que normaliza los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas. Estas alteraciones persistentes pueden tener consecuencias importantes en el funcionamiento del cerebro adulto. Esto sugiere que deberían evitarse en la medida de lo posible periodos de hipotiroidismo en el adulto sin tratar. Por tanto habría que mejorar la diagnosis de esta enfermedad y hacer una valoración más profunda de la utilización de protocolos clínicos que inducen hipotiroidismo en el adulto, incluso por breves periodos de tiempo.

Bibliografía

- Abel, T. & Kandel, E. (1998) Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 360-378.
- Abel, T. & Lattal, K.M. (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 180-187.
- Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R. & Bourtchouladze, R. (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 88, 615-626.
- Adell, A. & Artigas, F. (1998) A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *Br J Pharmacol*, 125, 1361-1367.
- Aggleton, J.P. (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci*, 16, 328-333.
- Aizenman, Y. & de Vellis, J. (1987) Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. *Brain Res*, 414, 301-308.
- Albrecht, J. & Schousboe, A. (2005) Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res*, 30, 1615-1621.
- Altshuler, L.L., Bauer, M., Frye, M.A., Gitlin, M.J., Mintz, J., Szuba, M.P., Leight, K.L. & Whybrow, P.C. (2001) Does thyroid supplementation accelerate tricyclic antidepressant response? A review and meta-analysis of the literature. *Am J Psychiatry*, 158, 1617-1622.
- Alzoubi, K.H., Aleisa, A.M. & Alkadhi, K.A. (2007) Adult-onset hypothyroidism facilitates and enhances LTD: reversal by chronic nicotine treatment. *Neurobiol Dis*, 26, 264-272.
- Alzoubi, K.H., Aleisa, A.M., Gerges, N.Z. & Alkadhi, K.A. (2006) Nicotine reverses adult-onset hypothyroidism-induced impairment of learning and memory: Behavioral and electrophysiological studies. *J Neurosci Res*, 84, 944-953.
- Alzoubi, K.H., Gerges, N.Z., Aleisa, A.M. & Alkadhi, K.A. (2009) Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies. *Hippocampus*, 19, 66-78.
- Alzoubi, K.H., Gerges, N.Z. & Alkadhi, K.A. (2005) Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of LTP of hippocampal CA1: electrophysiological and molecular studies. *Exp Neurol*, 195, 330-341.
- Andrioli, A., Alonso-Nanclares, L., Arellano, J.I. & DeFelipe, J. (2007) Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience*, 149, 131-143.
- Aranda, A. & Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-1304.

- Aronson, R., Offman, H.J., Joffe, R.T. & Naylor, C.D. (1996) Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*, 53, 842-848.
- Asher, R. (1949) Myxedematous madness. *BMJ*, 555-562.
- Baranyi, A., Szente, M.B. & Woody, C.D. (1991) Properties of associative long-lasting potentiation induced by cellular conditioning in the motor cortex of conscious cats. *Neuroscience*, 42, 321-334.
- Bauer, M., Heinz, A. & Whybrow, P.C. (2002) Thyroid hormones, serotonin and mood: of synergy and significance in the adult brain. *Mol Psychiatry*, 7, 140-156.
- Bazin, N., Perruchet, P., De Bonis, M. & Feline, A. (1994) The dissociation of explicit and implicit memory in depressed patients. *Psychol Med*, 24, 239-245.
- Bergh, J.J., Lin, H.Y., Lansing, L., Mohamed, S.N., Davis, F.B., Mousa, S. & Davis, P.J. (2005) Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146, 2864-2871.
- Bernal, J. (2005a) Pathophysiology of thyroid hormone deficiency during fetal development. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 18 Suppl 1, 1253-1256.
- Bernal, J. (2005b) Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm*, 71, 95-122.
- Bito, H., Deisseroth, K. & Tsien, R.W. (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87, 1203-1214.
- Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Bliss, T.V. & Gardner-Medwin, A.R. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 357-374.
- Bliss, T.V. & Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 331-356.
- Botella-Carretero, J.I., Galan, J.M., Caballero, C., Sancho, J. & Escobar-Morreale, H.F. (2003) Quality of life and psychometric functionality in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 10, 601-610.
- Boyages, S.C. (1996) The neuromuscular system and brain in hypothyroidism. In Braverman, L., Utiger, R. (eds) *Werner and Ingbar's "The Thyroid: A fundamental and clinical text"*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 631-633.
- Bozon, B., Davis, S. & Laroche, S. (2003) A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron*, 40, 695-701.

- Burmeister, L.A., Ganguli, M., Dodge, H.H., Toczek, T., DeKosky, S.T. & Nebes, R.D. (2001) Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory. *Thyroid*, 11, 1177-1185.
- Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M.R. & Marty, A. (2000) Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13372-13377.
- Cao, X., Kambe, F., Moeller, L.C., Refetoff, S. & Seo, H. (2005) Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol*, 19, 102-112.
- Capet, C., Jegou, A., Denis, P., Noel, D., Clerc, I., Cornier, A.C., Lefebvre, H., Levesque, H., Chassagne, P., Bercoff, E. & Doucet, J. (2000) [Is cognitive change related to hypothyroidism reversible with replacement therapy?]. *Rev Med Interne*, 21, 672-678.
- Ceballos, A., Belinchon, M.M., Sanchez-Mendoza, E., Grijota-Martinez, C., Dumitrescu, A.M., Refetoff, S., Morte, B. & Bernal, J. (2009) Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology*, 150, 2491-2496.
- Cediel, R., Riquelme, R., Contreras, J., Diaz, A. & Varela-Nieto, I. (2006) Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci*, 23, 587-590.
- Citri, A. & Malenka, R.C. (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, 18-41.
- Clark, R.E. & Squire, L.R. (1998) Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science*, 280, 77-81.
- Constant, E.L., de Volder, A.G., Ivanoiu, A., Bol, A., Labar, D., Seghers, A., Cosnard, G., Melin, J. & Daumerie, C. (2001) Cerebral blood flow and glucose metabolism in hypothyroidism: a positron emission tomography study. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 3864-3870.
- Courtin, F., Chantoux, F. & Francon, J. (1988) Thyroid hormone metabolism in neuron-enriched primary cultures of fetal rat brain cells. *Mol Cell Endocrinol*, 58, 73-84.
- Chapa, F., Kunnecke, B., Calvo, R., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. & Cerdán, S. (1995) Adult-onset hypothyroidism and the cerebral metabolism of (1,2-¹³C₂) acetate as detected by ¹³C nuclear magnetic resonance. *Endocrinology*, 136, 296-305.
- Chomez, P., Neveu, I., Mansen, A., Kiesler, E., Larsson, L., Vennström, B. & Arenas, E. (2000) Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the *reverbA(alpha)* orphan receptor. *Development*, 127, 1489-1498.
- Davis, P.J. & Davis, F.B. (2002) Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*, 12, 459-466.

- Davis, P.J., Davis, F.B. & Cody, V. (2005) Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 429-435.
- Davis, P.J., Leonard, J.L. & Davis, F.B. (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*, 29, 211-218.
- Davis, P.J., Shih, A., Lin, H.Y., Martino, L.J. & Davis, F.B. (2000) Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem*, 275, 38032-38039.
- Davis, P.J., Tillmann, H.C., Davis, F.B. & Wehling, M. (2002) Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. *J Endocrinol Invest*, 25, 377-388.
- de Escobar, G.M., Obregon, M.J. & del Rey, F.E. (2007) Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy. *Public Health Nutr*, 10, 1554-1570.
- del Olmo, N., Bustamante, J., del Rio, R.M. & Solis, J.M. (2000) Taurine activates GABA(A) but not GABA(B) receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Res*, 864, 298-307.
- del Ser Quijano, T., Delgado, C., Martinez Espinosa, S. & Vazquez, C. (2000) [Cognitive deficiency in mild hypothyroidism]. *Neurologia*, 15, 193-198.
- Denver, R.J., Hu, F., Scanlan, T.S. & Furlow, J.D. (2009) Thyroid hormone receptor subtype specificity for hormone-dependent neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 326, 155-168.
- Deol, M.S. (1973) An experimental approach to the understanding and treatment of hereditary syndromes with congenital deafness and hypothyroidism. *J Med Genet*, 10, 235-242.
- Di Lorenzo, L., Foggia, L., Panza, N., Calabrese, M.R., Motta, G., Tranchino, G., Orio, F., Jr. & Lombardi, G. (1995) Auditory brainstem responses in thyroid diseases before and after therapy. *Horm Res*, 43, 200-205.
- Dong, J., Yin, H., Liu, W., Wang, P., Jiang, Y. & Chen, J. (2005) Congenital iodine deficiency and hypothyroidism impair LTP and decrease C-fos and C-jun expression in rat hippocampus. *Neurotoxicology*, 26, 417-426.
- Dupre, S.M., Guissouma, H., Flamant, F., Seugnet, I., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Samarut, J., Demeneix, B.A. & Becker, N. (2004) Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 145, 2337-2345.
- Escámez, M.J., Guadaño-Ferraz, A., Cuadrado, A. & Bernal, J. (1999) Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology*, 140, 5443-5446.
- Escobar-Morreale, H.F., del Rey, F.E., Obregón, M.J. & de Escobar, G.M. (1996) Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology*, 137, 2490-2502.

- Fernández-Lamo, I., Montero-Pedrazuela, A., Delgado-García, J.M., Guadaño-Ferraz, A. & Gruart, A. (2009) Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. *Eur J Neurosci*, *in press*.
- Freedman, L.P. (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev*, 13, 129-145.
- Freund, T.F. & Buzsaki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 347-470.
- Friesema, E.C., Jansen, J., Milici, C. & Visser, T.J. (2005) Thyroid hormone transporters. *Vitam Horm*, 70, 137-167.
- Gerges, N.Z. & Alkadhi, K.A. (2004) Hypothyroidism impairs late LTP in CA1 region but not in dentate gyrus of the intact rat hippocampus: MAPK involvement. *Hippocampus*, 14, 40-45.
- Gerges, N.Z., Stringer, J.L. & Alkadhi, K.A. (2001) Combination of hypothyroidism and stress abolishes early LTP in the CA1 but not dentate gyrus of hippocampus of adult rats. *Brain Res*, 922, 250-260.
- Gilbert, M.E., Sui, L., Walker, M.J., Anderson, W., Thomas, S., Smoller, S.N., Schon, J.P., Phani, S. & Goodman, J.H. (2007) Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology*, 148, 92-102.
- Gloger, S., Fardella, C., Santis, R. & Bitran, J. (1997) [Relevance of the thyroid function assessment in psychiatric patients]. *Rev Med Chil*, 125, 1351-1356.
- Gold, M.S., Pottash, A.L. & Extein, I. (1981) Hypothyroidism and depression. Evidence from complete thyroid function evaluation. *Jama*, 245, 1919-1922.
- Gordon, J.T., Crutchfield, F.L., Jennings, A.S. & Dratman, M.B. (1982) Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites. *Arch Biochem Biophys*, 216, 407-415.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. & Shors, T.J. (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, 2, 260-265.
- Gould, E., Woolley, C.S. & McEwen, B.S. (1991) The hippocampal formation: morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology*, 16, 67-84.
- Gruart, A., Munoz, M.D. & Delgado-Garcia, J.M. (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*, 26, 1077-1087.
- Guadaño-Ferraz, A., Benavides-Piccione, R., Venero, C., Lancha, C., Vennström, B., Sandi, C., DeFelipe, J. & Bernal, J. (2003) Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry*, 8, 30-38.

- Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Morte, B., Vargiu, P. & Bernal, J. (1997a) Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 49, 37-44.
- Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Rausell, E. & Bernal, J. (1999) Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci*, 19, 3430-3439.
- Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M.J., St Germain, D.L. & Bernal, J. (1997b) The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10391-10396.
- Haggerty, J.J., Jr., Garbutt, J.C., Evans, D.L., Golden, R.N., Pedersen, C., Simon, J.S. & Nemeroff, C.B. (1990) Subclinical hypothyroidism: a review of neuropsychiatric aspects. *Int J Psychiatry Med*, 20, 193-208.
- Haggerty, J.J., Jr. & Prange, A.J., Jr. (1995) Borderline hypothyroidism and depression. *Annu Rev Med*, 46, 37-46.
- Han, K. & Kim, E. (2008) Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog Neurobiol*, 84, 263-283.
- Harmer, C.J., Clark, L., Grayson, L. & Goodwin, G.M. (2002) Sustained attention deficit in bipolar disorder is not a working memory impairment in disguise. *Neuropsychologia*, 40, 1586-1590.
- Harvey, C.B. & Williams, G.R. (2002) Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*, 12, 441-446.
- Hebb, D.O. (1949) *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*.
- Hiroi, Y., Kim, H.H., Ying, H., Furuya, F., Huang, Z., Simoncini, T., Noma, K., Ueki, K., Nguyen, N.H., Scanlan, T.S., Moskowitz, M.A., Cheng, S.Y. & Liao, J.K. (2006) Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14104-14109.
- Hong, T.P., Huang, T.Y. & Qiu, X.C. (1992) [Effects of different thyroid states on 5-HT_{1A} receptor in adult rat brain]. *Sheng Li Xue Bao*, 44, 75-80.
- Howland, R.H. (1993) Thyroid dysfunction in refractory depression: implications for pathophysiology and treatment. *J Clin Psychiatry*, 54, 47-54.
- Jansen, J., Friesema, E.C., Milici, C. & Visser, T.J. (2005) Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid*, 15, 757-768.
- Jeffery, K.J., Abraham, W.C., Dragunow, M. & Mason, S.E. (1990) Induction of Fos-like immunoreactivity and the maintenance of long-term potentiation in the dentate gyrus of unanesthetized rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 8, 267-274.
- Jellinek, E.H. (1962) Fits, faints, coma, and dementia in myxoedema. *Lancet*, 2, 1010-1012.

- Jensovsky, J., Ruzicka, E., Spackova, N. & Hejdukova, B. (2002) Changes of event related potential and cognitive processes in patients with subclinical hypothyroidism after thyroxine treatment. *Endocr Regul*, 36, 115-122.
- Jinno, S. & Kosaka, T. (2006) Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res*, 56, 229-245.
- Joffe, R.T. & Levitt, A.J. (1993) The thyroid and depression. In Joffe, R.T., Levitt, A.J. (eds) *The Thyroid Axis and Psychiatric Illness*. American Psychiatric Press, Washington, pp. 195-253.
- Joffe, R.T. & Singer, W. (1990) A comparison of triiodothyronine and thyroxine in the potentiation of tricyclic antidepressants. *Psychiatry Res*, 32, 241-251.
- Kalaria, R.N. & Prince, A.K. (1986) Decreased neurotransmitter receptor binding in striatum and cortex from adult hypothyroid rats. *Brain Res*, 364, 268-274.
- Kandel, E.R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294, 1030-1038.
- Kaplan, M.M. & Yaskoski, K.A. (1981) Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J Clin Invest*, 67, 1208-1214.
- Kempermann, G. (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 22, 635-638.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-495.
- Kirkegaard, C. & Faber, J. (1998) The role of thyroid hormones in depression. *Eur J Endocrinol*, 138, 1-9.
- Köhrle, J. (2002) Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol*, 347, 125-167.
- Kolb, B. (1999) Towards an ecology of cortical organization: experience and the changing brain. In Grafman, J., Christen, Y. (eds) *Neuronal plasticity: building a bridge from the laboratory to the clinic*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 173-174.
- Kulikov, A., Moreau, X. & Jeanningros, R. (1999) Effects of experimental hypothyroidism on 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors, 5-HT uptake sites and tryptophan hydroxylase activity in mature rat brain. *Neuroendocrinology*, 69, 453-459.
- Lauri, S.E., Palmer, M., Segerstrale, M., Vesikansa, A., Taira, T. & Collingridge, G.L. (2007) Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 52, 1-11.
- Lazar, M.A. (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*, 14, 184-193.

- Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S. & Chin, W.W. (1989) A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol*, 9, 1128-1136.
- LeDoux, J.E. (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res*, 58, 69-79.
- Lee, P.R., Brady, D. & Koenig, J.I. (2003) Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J Neuroendocrinol*, 15, 87-92.
- Leentjens, A.F. & Kappers, E.J. (1995) Persistent cognitive defects after corrected hypothyroidism. *Psychopathology*, 28, 235-237.
- Li, Q., Sachs, L., Shi, Y.B. & Wolffe, A.P. (1999) Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 10, 157-164.
- Lindvall-Axelsson, M., Hedner, P., Owman, C. & Winbladh, B. (1985) Influence of thyroid hormones on transport function and Na⁺-K⁺-ATPase activity in the rat choroid plexus. *Acta Physiol Scand*, 125, 627-632.
- Madeira, M.D., Cadete-Leite, A., Andrade, J.P. & Paula-Barbosa, M.M. (1991) Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. *J Comp Neurol*, 314, 171-186.
- Madeira, M.D., Sousa, N., Lima-Andrade, M.T., Calheiros, F., Cadete-Leite, A. & Paula-Barbosa, M.M. (1992) Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. *J Comp Neurol*, 322, 501-518.
- Madroñal, N., Gruart, A. & Delgado-Garcia, J.M. (2009) Differing presynaptic contributions to LTP and associative learning in behaving mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *in press*.
- Magee, J.C. & Johnston, D. (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science*, 275, 209-213.
- Maia, A.L., Kim, B.W., Huang, S.A., Harney, J.W. & Larsen, P.R. (2005) Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest*, 115, 2524-2533.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A. & Waxham, M.N. (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*, 340, 554-557.
- Manzano, J., Cuadrado, M., Morte, B. & Bernal, J. (2007) Influence of thyroid hormone and thyroid hormone receptors in the generation of cerebellar gamma-aminobutyric acid-ergic interneurons from precursor cells. *Endocrinology*, 148, 5746-5751.
- Manzano, J., Morte, B., Scanlan, T.S. & Bernal, J. (2003) Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. *Endocrinology*, 144, 5480-5487.
- Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M. & Sakmann, B. (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science*, 275, 213-215.

- Martin, S.J., Grimwood, P.D. & Morris, R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 23, 649-711.
- Martínez-Galán, J.R., Pedraza, P., Santacana, M., Escobar del Ray, F., Morreale de Escobar, G. & Ruiz-Marcos, A. (1997) Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J Clin Invest*, 99, 2701-2709.
- Martinez, B., Rodrigues, T.B., Gine, E., Kaninda, J.P., Perez-Castillo, A. & Santos, A. (2009) Hypothyroidism decreases the biogenesis in free mitochondria and neuronal oxygen consumption in the cerebral cortex of developing rats. *Endocrinology*.
- Mason, G.A., Bondy, S.C., Nemeroff, C.B., Walker, C.H. & Prange, A.J., Jr. (1987) The effects of thyroid state on beta-adrenergic and serotonergic receptors in rat brain. *Psychoneuroendocrinology*, 12, 261-270.
- McGaugh, J.L., Cahill, L. & Roozendaal, B. (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13508-13514.
- McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A. & Tonegawa, S. (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*, 317, 94-99.
- Mennemeier, M., Garner, R.D. & Heilman, K.M. (1993) Memory, mood and measurement in hypothyroidism. *J Clin Exp Neuropsychol*, 15, 822-831.
- Milner, B., Squire, L.R. & Kandel, E.R. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20, 445-468.
- Mishkin, M. & Appenzeller, T. (1987) The anatomy of memory. *Sci Am*, 256, 80-89.
- Mishkin, M., Suzuki, W.A., Gadian, D.G. & Vargha-Khadem, F. (1997) Hierarchical organization of cognitive memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352, 1461-1467.
- Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S., Matsubara, K., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1989) Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell*, 57, 31-39.
- Moeller, L.C., Cao, X., Dumitrescu, A.M., Seo, H. & Refetoff, S. (2006) Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal*, 4, e020.
- Montero-Pedrazuela, A., Venero, C., Lavado-Autric, R., Fernandez-Lamo, I., Garcia-Verdugo, J.M., Bernal, J. & Guadano-Ferraz, A. (2006) Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry*, 11, 361-371.

- Monzani, F., Del Guerra, P., Caraccio, N., Pruneti, C.A., Pucci, E., Luisi, M. & Baschieri, L. (1993) Subclinical hypothyroidism: neurobehavioral features and beneficial effect of L-thyroxine treatment. *Clin Invest*, 71, 367-371.
- Moore, G.J. & Galloway, M.P. (2002) Magnetic resonance spectroscopy: neurochemistry and treatment effects in affective disorders. *Psychopharmacol Bull*, 36, 5-23.
- Morreale de Escobar, G., Calvo, R., Escobar del Rey, F. & Obregón, M.J. (1994) Thyroid hormones in tissues from fetal and adult rats. *Endocrinology*, 134, 2410-2415.
- Morreale de Escobar, G., Pastor, R., Obregón, M.J. & Escobar del Rey, F. (1985) Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*, 117, 1890-1900.
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennström, B. & Bernal, J. (2002) Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3985-3989.
- Mouton, P.R., Price, D.L. & Walker, L.C. (1997) Empirical assessment of synapse numbers in primate neocortex. *J Neurosci Methods*, 75, 119-126.
- Moyer, J.R., Jr., Deyo, R.A. & Disterhoft, J.F. (1990) Hippocampectomy disrupts trace eye-blink conditioning in rabbits. *Behav Neurosci*, 104, 243-252.
- Nacher, J., Crespo, C. & McEwen, B.S. (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci*, 14, 629-644.
- Nacher, J., Varea, E., Miguel Blasco-Ibanez, J., Gomez-Climent, M.A., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F.J. & McEwen, B.S. (2007) N-methyl-D-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Neuroscience*, 144, 855-864.
- Nakashiba, T., Young, J.Z., McHugh, T.J., Buhl, D.L. & Tonegawa, S. (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science*, 319, 1260-1264.
- Ng, L., Hurley, J.B., Dierks, B., Srinivas, M., Salto, C., Vennström, B., Reh, T.A. & Forrest, D. (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet*, 27, 94-98.
- Nikonenko, A.G., Sun, M., Lepsveridze, E., Apostolova, I., Petrova, I., Irintchev, A., Dityatev, A. & Schachner, M. (2006) Enhanced perisomatic inhibition and impaired long-term potentiation in the CA1 region of juvenile CHL1-deficient mice. *Eur J Neurosci*, 23, 1839-1852.
- Norberg, J., Kristensen, B.W. & Zimmer, J. (1999) Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc*, 3, 278-290.
- Obregón, M.J., Mallol, J., Escobar del Rey, F. & Morreale de Escobar, G. (1981) Presence of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in tissues from thyroidectomized rats. *Endocrinology*, 109, 908-913.

- Obregón, M.J., Morreale de Escobar, G. & Escobar del Rey, F. (1978) Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology*, 103, 2145-2153.
- Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C., Calvo, R., Escobar del Rey, F. & Morreale de Escobar, G. (1991) Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology*, 129, 2663-2673.
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Mariash, C.N., Kinlaw, W.B., Wong, N.C. & Freake, H.C. (1987) Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev*, 8, 288-308.
- Ord, W.M. (1888) Report of a committee nominated on December 14, 1883 to investigate the subject of myxoedema. *Transactions of the Clinical Society of London* 21 (Suppl.).
- Osterweil, D., Syndulko, K., Cohen, S.N., Pettler-Jennings, P.D., Hershman, J.M., Cummings, J.L., Tourtellotte, W.W. & Solomon, D.H. (1992) Cognitive function in non-demented older adults with hypothyroidism. *J Am Geriatr Soc*, 40, 325-335.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A. & Sacktor, T.C. (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 313, 1141-1144.
- Pavlov, I.P. (1927) *Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Oxford University Press, London.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Inc., London.
- Prange, A.J., Jr. (1996) Novel uses of thyroid hormones in patients with affective disorders. *Thyroid*, 6, 537-543.
- Prange, A.J., Jr., Wilson, I.C., Lynn, C.W., Alltop, L.B. & Stikeleather, R.A. (1974) L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 30, 56-62.
- Prange, A.J., Jr., Wilson, I.C., Rabon, A.M. & Lipton, M.A. (1969) Enhancement of imipramine antidepressant activity by thyroid hormone. *Am J Psychiatry*, 126, 457-469.
- Prange, O., Wong, T.P., Gerrow, K., Wang, Y.T. & El-Husseini, A. (2004) A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13915-13920.
- Puymirat, J., Miche, M., Marchand, R., Sarlieve, L. & Dussault, J.H. (1991) Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid*, 1, 173-184.

- Rami, A., Patel, A.J. & Rabie, A. (1986a) Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience*, 19, 1217-1226.
- Rami, A., Rabie, A. & Patel, A.J. (1986b) Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 19, 1207-1216.
- Ribak, C.E. (1978) Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol*, 7, 461-478.
- Ribak, C.E., Korn, M.J., Shan, Z. & Obenaus, A. (2004) Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res*, 1000, 195-199.
- Roberts, C.G. & Ladenson, P.W. (2004) Hypothyroidism. *Lancet*, 363, 793-803.
- Roberts, L.M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D.S., Haggerty, J.E., Tate, E.H., Grindstaff, K.K., Mengesha, W., Raman, C. & Zerangue, N. (2008) Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*, 149, 6251-6261.
- Roediger, H.L., 3rd & McDermott, K.B. (1992) Depression and implicit memory: a commentary. *J Abnorm Psychol*, 101, 587-591.
- Roussel, J.P., Grazzini, E., Zumbihl, R., Rodriguez, E. & Astier, H. (1995) Triiodo-L-thyronine enhances TRH-induced TSH release from perfused rat pituitaries and intracellular Ca²⁺ levels from dispersed pituitary cells. *Eur J Pharmacol*, 289, 205-215.
- Rovet, J., Walker, W., Bliss, B., Buchanan, L. & Ehrlich, R. (1996) Long-term sequelae of hearing impairment in congenital hypothyroidism. *J Pediatr*, 128, 776-783.
- Rozanov, C.B. & Dratman, M.B. (1996) Immunohistochemical mapping of brain triiodothyronine reveals prominent localization in central noradrenergic systems. *Neuroscience*, 74, 897-915.
- Ruiz de Oña, C., Morreale de Escobar, G., Calvo, R., Escobar del Rey, F. & Obregón, M.J. (1991) Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology*, 128, 422-432.
- Samuels, M.H., Schuff, K.G., Carlson, N.E., Carello, P. & Janowsky, J.S. (2007) Health status, mood, and cognition in experimentally induced subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 2545-2551.
- Saravanan, P., Chau, W.F., Roberts, N., Vedhara, K., Greenwood, R. & Dayan, C.M. (2002) Psychological well-being in patients on 'adequate' doses of l-thyroxine: results of a large, controlled community-based questionnaire study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 57, 577-585.
- Sarkar, P.K. (2008) L-triiodothyronine differentially and nongenomically regulates synaptosomal protein phosphorylation in adult rat brain cerebral cortex: role of calcium and calmodulin. *Life Sci*, 82, 920-927.

- Savard, P., Merand, Y., Di Paolo, T. & Dupont, A. (1984) Effect of neonatal hypothyroidism on the serotonin system of the rat brain. *Brain Res*, 292, 99-108.
- Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., Hen, R. & Drew, M.R. (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17501-17506.
- Scoville, W.B. & Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20, 11-21.
- Schildkraut, J.J. (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122, 509-522.
- Segal, J. & Ingbar, S.H. (1982) Specific binding sites for the triiodothyronine in the plasma membrane of rat thymocytes. Correlation with biochemical responses. *J Clin Invest*, 70, 919-926.
- Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A. & Gado, M.H. (1999) Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*, 19, 5034-5043.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. & Gould, E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410, 372-376.
- Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. & Gould, E. (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12, 578-584.
- Silva, J.E. & Larsen, P.R. (1986) Regulation at the prereceptor and receptor levels. In Henneman, G. (ed) *Thyroid Hormone Metabolism*. Marcel Dekker, New York, pp. 441-500.
- Singhal, R.L., Rastogi, R.B. & Hrdina, P.D. (1975) Brain biogenic amines and altered thyroid function. *Life Sci*, 17, 1617-1626.
- Smith, C.D. & Ain, K.B. (1995) Brain metabolism in hypothyroidism studied with ³¹P magnetic-resonance spectroscopy. *Lancet*, 345, 619-620.
- Solomon, P.R., Vander Schaaf, E.R., Thompson, R.F. & Weisz, D.J. (1986) Hippocampus and trace conditioning of the rabbit's classically conditioned nictitating membrane response. *Behav Neurosci*, 100, 729-744.
- Sui, L., Wang, F. & Li, B.M. (2006) Adult-onset hypothyroidism impairs paired-pulse facilitation and long-term potentiation of the rat dorsal hippocampo-medial prefrontal cortex pathway in vivo. *Brain Res*, 1096, 53-60.
- Surks, M.I. & Oppenheimer, J.H. (1977) Concentration of L-thyroxine and L-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat liver and kidney. Quantitative evidence favoring a major role of T₃ in thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 60, 555-562.

- Tagay, S., Herpertz, S., Langkafel, M., Erim, Y., Freudenberg, L., Schopper, N., Bockisch, A., Senf, W. & Gorges, R. (2005) Health-related quality of life, anxiety and depression in thyroid cancer patients under short-term hypothyroidism and TSH-suppressive levothyroxine treatment. *Eur J Endocrinol*, 153, 755-763.
- Tang, H.Y., Lin, H.Y., Zhang, S., Davis, F.B. & Davis, P.J. (2004) Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology*, 145, 3265-3272.
- Tejani-Butt, S.M., Yang, J. & Kaviani, A. (1993) Time course of altered thyroid states on 5-HT_{1A} receptors and 5-HT uptake sites in rat brain: an autoradiographic analysis. *Neuroendocrinology*, 57, 1011-1018.
- Thomson, A.M. (2000) Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci*, 23, 305-312.
- Toledo-Rodriguez, M., Goodman, P., Illic, M., Wu, C. & Markram, H. (2005) Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J Physiol*, 567, 401-413.
- Toro, C. & Deakin, J.F. (2005) NMDA receptor subunit NRI and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. *Schizophr Res*, 80, 323-330.
- Treadway, C.R., Prange, A.J., Jr., Doehne, E.F., Edens, C.J. & Whybrow, P.C. (1967) Myxedema psychosis: clinical and biochemical changes during recovery. *J Psychiatr Res*, 5, 289-296.
- Tsacopoulos, M. & Magistretti, P.J. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*, 16, 877-885.
- Upadhyaya, L. & Agrawal, J.K. (1993) Effect of L-thyroxine and carbimazole on brain biogenic amines and amino acids in rats. *Endocr Res*, 19, 87-99.
- Valenzuela-Harrington, M., Gruart, A. & Delgado-Garcia, J.M. (2007) Contribution of NMDA receptor NR2B subunit to synaptic plasticity during associative learning in behaving rats. *Eur J Neurosci*, 25, 830-836.
- Vanderpump, M.P. & Tunbridge, W.M. (2002) Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid*, 12, 839-847.
- Venero, C., Guadaño-Ferraz, A., Herrero, A.I., Nordström, K., Manzano, J., de Escobar, G.M., Bernal, J. & Vennström, B. (2005) Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T₃ treatment. *Genes Dev*, 19, 2152-2163.
- Virgili, M., Saverino, O., Vaccari, M., Barnabei, O. & Contestabile, A. (1991) Temporal, regional and cellular selectivity of neonatal alteration of the thyroid state on neurochemical maturation in the rat. *Exp Brain Res*, 83, 555-561.

- Vizi, E.S. & Kiss, J.P. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, 8, 566-607.
- Weeke, J. & Orskov, H. (1973) Synthesis of ¹²⁵I monolabelled 3, 5, 3'-triiodothyronine and thyroxine of maximum specific activity for radioimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest*, 32, 357-360.
- Weeke, J. & Orskov, H. (1975) Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest*, 35, 237-244.
- Weisz, D.J., Clark, G.A. & Thompson, R.F. (1984) Increased responsivity of dentate granule cells during nictitating membrane response conditioning in rabbit. *Behav Brain Res*, 12, 145-154.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G. & Bear, M.F. (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313, 1093-1097.
- Whybrow, P.C. (1996) Behavioral and psychiatric manifestations of hypothyroidism. In Braverman, L., Utiger, R. (eds) *Werner and Ingbar's "The thyroid: a fundamental and clinical text"*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 866-870.
- Whybrow, P.C. & Prange, A.J., Jr. (1981) A hypothesis of thyroid-catecholamine-receptor interaction. Its relevance to affective illness. *Arch Gen Psychiatry*, 38, 106-113.
- Whybrow, P.C., Prange, A.J., Jr. & Treadway, C.R. (1969) Mental changes accompanying thyroid gland dysfunction. A reappraisal using objective psychological measurement. *Arch Gen Psychiatry*, 20, 48-63.
- Williams, R.W. & Rakic, P. (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol*, 278, 344-352.
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F. & Cabello, G. (2001) Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol*, 26, 67-77.
- Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*, 81, 1097-1142.
- Yorns, W.R., Jr., Blaise, J.H. & Bronzino, J.D. (2004) Frequency-dependent changes in the paired-pulse index in the hippocampus of the freely moving adult male rat. *Exp Neurol*, 186, 104-108.
- Zakzanis, K.K., Leach, L. & Kaplan, E. (1998) On the nature and pattern of neurocognitive function in major depressive disorder. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 11, 111-119.
- Zamoner, A., Heimfarth, L. & Pessoa-Pureur, R. (2008) Congenital hypothyroidism is associated with intermediate filament misregulation, glutamate transporters down-regulation and MAPK activation in developing rat brain. *Neurotoxicology*, 29, 1092-1099.
- Zarrow, M.X., Yochim, J.M. & McCarthy, J.L. (1964) *Experimental Endocrinology: A Sourcebook of Basic Techniques*. Academic Press, Inc., London.

- Zola-Morgan, S., Squire, L.R. & Ramus, S.J. (1994) Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system. *Hippocampus*, 4, 483-495.
- Zucker, R.S. & Regehr, W.G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, 355-405.